

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

ANTIPROTOZOÁLNÍ AKTIVITA PŘÍRODNÍCH LÁTEK

ANTIPROTOZOAL ACTIVITY OF NATURAL COMPOUNDS

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové 2012

Michaela Muchová

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Hradec Králové

.....

31. 8. 2012

PODĚKOVÁNÍ:

Ráda bych poděkovala RNDr. Jitce Vytlačilové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při zpracování této diplomové práce a také své rodině za podporu po celou dobu studia.

Tato práce vznikla za grantové podpory SVV UK 265 002.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. CÍL PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1. Onemocnění způsobená prvoky	10
3.1.1. Intestinální a vaginální protozoální infekce	10
3.1.1.1. Giardióza	10
3.1.1.2. Amébióza	10
3.1.1.3. Balantidióza	12
3.1.1.4. Trichomonóza	12
3.1.2. Krevní a tkáňové protozoální infekce	13
3.1.2.1. Leishmanióza	13
3.1.2.2. Trypanosomóza	14
3.1.2.3. Toxoplazmóza	14
3.1.2.4. Pneumocystóza	15
3.1.2.5. Malárie	15
3.2. Testované látky	17
3.2.1. Berberin	17
3.2.2. Palmatin	19
3.2.3. Papaverin	22
3.2.4. Ornidazol	23
3.3. Testovaný organismus <i>Tetrahymena thermophila</i>	26
3.3.1. Taxonomické zařazení	26
3.3.2. Charakteristika	29
3.3.3. <i>Tetrahymena thermophila</i> jako modelový organismus	29
3.3.4. Jádra, rozmnožování	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1. Popis metody	31
4.2. Pomůcky, přístroje, chemikálie	31
4.2.1. Použité pomůcky	31

4.2.2. Použité přístroje	32
4.2.3. Použité chemikálie	32
4.3. Vlastní provedení testu	33
4.3.1. Postup přípravy	33
4.3.2. Vyhodnocení testu	35
5. VÝSLEDKOVÁ ČÁST	36
5.1. Berberin	37
5.2. Palmatin	38
5.3. Papaverin	39
5.4. Ornidazol	40
6. DISKUSE.....	41
7. ZÁVĚR	46
8. VÝKLAD NĚKTERÝCH POJMŮ	47
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
Abstrakt.....	55
Abstract	56

1. ÚVOD

Prvoci jsou jednobuněčné organismy mikroskopických rozměrů s eukaryotickým typem buňky. Z hlediska taxonomie nejsou považováni za přirozenou skupinu, ale za soubor organismů zahrnující jedince různých vývojových linií (Hausmann *et al.*, 2003).

Tato skupina zahrnuje zástupce volně žijící i symbiotické. Symbióza je obecné označení pro vztah dvou různých organismů, které žijí spolu v těsném spojení. Podle povahy vzájemného působení rozlišujeme mutualismus, pokud je tato koexistence pro oba jedince prospěšná, nebo parazitismus, kdy je hostitelský organismus poškozován na úkor parazitujícího organismu (Hausmann *et al.*, 2003).

Právě parazitičtí prvoci jsou zodpovědní za onemocnění postihující člověka a mají také značný epidemiologický a hospodářský význam u protozoálních infekcí domácích zvířat (Hartl *et al.*, 2006).

Protozoální infekce se vyskytují buď kosmopolitně (např. toxoplazmóza, trichomonóza) nebo jsou charakteristické jen pro tropické a subtropické oblasti (např. malárie, leishmanióza). Onemocnění způsobená prvoky jsou různě závažná. Někdy probíhá bez zjevných příznaků nebo má lehký průběh. I přesto však může být nakažený pacient asymptomatickým přenašečem a šíří infekci dál (Hartl *et al.*, 2006).

Jako antiprotozoika se původně používaly organické sloučeniny těžkých kovů (rtuť, zlato, měď), které ovšem byly kvůli vysoké toxicitě postupně nahrazovány méně jedovatými sloučeninami polokovů (arsen, antimon, bismut). Některé tyto látky se v terapii používají dodnes. Dále se uplatňují některá antibiotika a chemoterapeutika, která působí nejen proti bakteriím, ale i proti prvokům (Hartl *et al.*, 2006).

Hlavním problémem při terapii protozoálních chorob je narůstající rezistence patogenních organismů vůči léčivům. Příkladem může být snížená účinnost mnoha antimalarik. U některých rezistentních parazitů způsobujících malárii byla zjištěna ve srovnání s citlivými patogeny výrazně nižší koncentrace léčiva v trávicích vakuolách. Znamená to, že se antimalarikum kumuluje mnohem méně a nedosahuje koncentrací nutných pro terapeutický účinek. Jednou z hypotéz mechanismu vzniku rezistence je, že do membrány trávicích vakuol parazita se zabuduje transportní protein, který proti

gradientu vytěsňuje z nitra vakuoly cizorodé látky, např. farmaka. To zabraňuje dosažení účinné koncentrace léčiv a snížení účinnosti (Lüllmann *et al.*, 2004).

Rezistenci a značné vedlejší účinky u terapeuticky užívaných dávek antiprotozoik se snaží vyřešit rozsáhlé výzkumné aktivity, jejichž cílem je najít nové látky vykazující antiprotozoální aktivitu. Předmětem bádání jsou mimo jiné rostlinné látky používané v tradiční medicíně, které jsou využívány v terapii mnoha onemocnění díky svému širokému spektru účinků (Taylor *et al.*, 2006).

2. CÍL PRÁCE

Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové v rámci pracovní skupiny ADINACO probíhá dlouhodobě výzkum a vyhledávání přírodních látek, které by mohly v budoucnu pomoci ke zmírnění příznaků Alzheimerovy choroby. Námi zvolený test antiprotozoální aktivity (test s jednobuněčným organismem *Tetrahymena thermophila*) v tomto případě slouží ke screeningu zajímavých alkaloidů a nahrazuje do určité míry klasické cytotoxické testy s nádorovými liniemi buněk.

Cílem této práce je zjistit antiprotozoální aktivitu alkaloidů berberinu, palmatinu a papaverinu ve srovnání s ornidazolem. Ornidazol je látka s prokázanou antiprotozoální aktivitou.

3. TEORETICKÁ ČÁST

Tato kapitola obsahuje základní informace o nemocech způsobených prvoky, o testovaných látkách a testovaném organismu.

3.1. Onemocnění způsobená prvoky

Člověk je hostitelem celé řady protozoálních parazitů, kteří mohou být přenášeni hmyzem, jinými savci nebo z jedné osoby na druhou. Vzhledem k tomu, že prvoci se ve svém hostiteli rychle množí a efektivní očkovací látky nejsou dostupné, je chemoterapie jediná praktická cesta, jak léčit infikované jedince a snížit přenos onemocnění (Goodman *et al.*, 2011).

Protozoa patří mezi nejčastější původce onemocnění především v tropech. Vzhledem k rozšířenému cestovnímu ruchu musíme i v našich podmínkách počítat s výskytem těchto onemocnění. Jednotlivé protozoální choroby jsou různě závažné, někdy mohou probíhat letálně. Existuje řada primárně dobře účinných chemoterapeutik, nicméně schopnost protozoí vyvíjet rezistenci velmi znesnadňuje farmakoterapii (Lüllmann *et al.*, 2004).

Klíčovou roli v ochraně proti následkům protozoálních onemocnění hraje imunitní systém. Oportunní protozoální infekce se vyskytují především u dětí, jedinců s rakovinou, po transplantaci, u pacientů užívajících imunosupresivní léky a u osob s pokročilou formou infekce způsobené virem lidské imunodeficiencie (HIV) (Goodman *et al.*, 2011).

Rozdělení protozoálních chorob se v různých zdrojích literatury liší, zde je použito členění do skupin podle Základní a aplikované farmakologie pro farmaceuty.

Všechny protozoální choroby je možné rozdělit do dvou, resp. tří skupin: První skupinu tvoří **intestinální protozoózy** (giardióza, amébóza a balantidióza) a **vaginální protozoóza** (trichomonóza). Do druhé skupiny onemocnění patří **krevní a tkáňové protozoózy** (leishmanióza, trypanozomóza, toxoplazmóza a s jistou výhradou také pneumocystózy) a **malárie** (Lincová *et al.*, 2007).

3.1.1. Intestinální a vaginální protozoální onemocnění

3.1.1.1. Giardióza

Druh rodu *Giardia*, který infikuje člověka a způsobuje giardiózu, se nazývá *Giardia duodenalis* (syn. *Giardia lamblia*, *Giardia intestinalis*). Jiné druhy (např. *Giardia muris*) infikují pouze další živočichy (hlodavce, ptáky, plazy) (Dawson, 2005).

Infekce vzniká po požití cystické formy parazita v kontaminované vodě nebo potravě (Goodman *et al.*, 2011). Cysta se dostane do dvanáctníku, kde dojde k excystaci a vzniku dvou trofozoitů. Ty se pak rychle nepohlavně množí a osídlují tenké střevo. Během této fáze se objevují klinické příznaky, které jsou výsledkem poškození střevní sliznice. Některé trofozoity opět vytváří cysty a ukončují tak cyklus. Ovoidní cysty jsou vylučovány stolicí (Dawson, 2005).

Infekce se může projevit akutním průjmem, chronickým průjmem nebo onemocnění probíhá asymptomaticky. Asymptomatická infekce je nejčastější, jedinci vylučují cysty a jsou zdrojem nových infekcí. U pacientů se symptomatickou akutní infekcí se vyskytuje vodnatý průjem a nadýmání. Avšak u značné části těchto jedinců se vyvine chronický průjemový syndrom (trvá déle než dva týdny) s příznaky malabsorpce a ztráty hmotnosti (Goodman *et al.*, 2011).

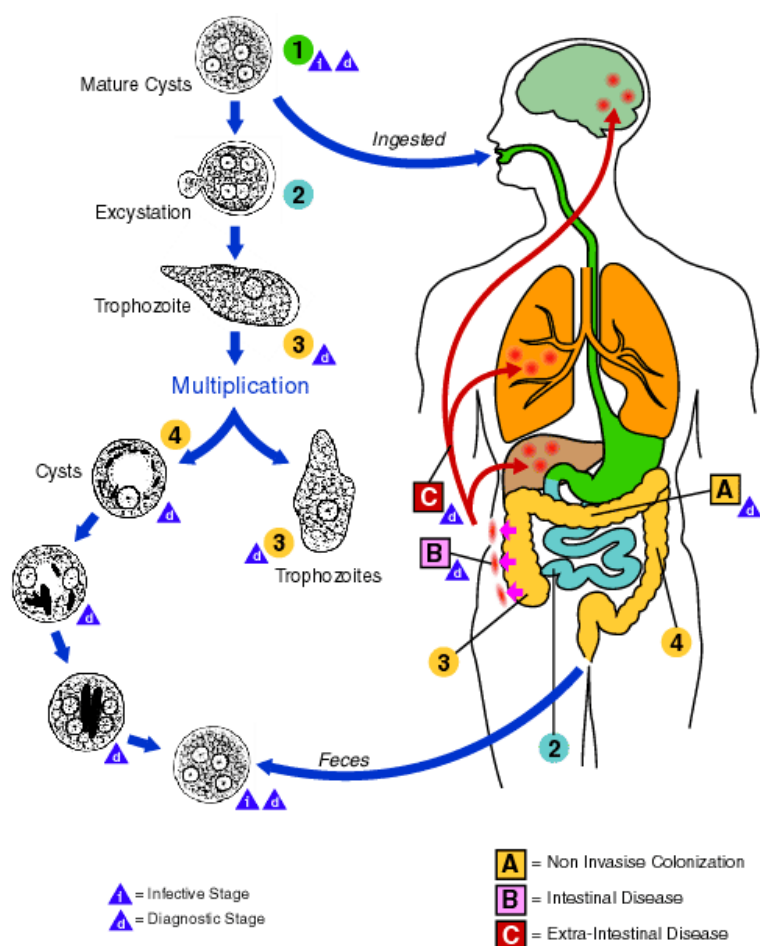
3.1.1.2. Amébióza

Amébiózu způsobuje prvok *Entamoeba histolytica*, který je endemický v některých zemích např. blízké a střední Asie a všude tam, kde je hygiena obecně na nižší úrovni (Lincová *et al.*, 2007).

Z infikovaných osob byly izolovány tři morfologicky stejné, ale geneticky odlišné druhy rodu *Entamoeba* – *E. histolytica*, *E. dispar* a *E. moshkovskii*. 90 % lidských nákaz způsobují druhy *E. dispar* a *E. moshkovskii* a jen 10 % je způsobeno druhem *E. histolytica*.

Avšak pouze *E. histolytica* je schopen vyvolat onemocnění vyžadující léčbu (Goodman *et al.*, 2011).

Po požití cyst, které se nachází v kontaminované potravě a vodě, nejsou u většiny lidí přítomny žádné symptomy, jen u některých se může vyvinout závažná dyzentérie, která je charakterizována četnými průjmy, které obsahují krev a hnis. Tuto formu dyzentérie způsobuje pohyblivý trofozoit, který pohlcuje krvinky hostitele. Vzácněji se trofozoity mohou dostat portální krví do jater, kde působí akutní jaterní amébovou hepatitidu, nebo se encystují a vytvářejí nebezpečný jaterní amébový absces. U asymptomatické formy se trofozoity dostávají z tenkého střeva až do tlustého střeva a konečníku, kde dochází k encystaci, a jsou ve formě cyst vylučovány stolicí (Lincová *et al.*, 2007).



Obr. 1: Životní cyklus prvoka *Entamoeba histolytica*

(www.health-pic.com/pathogenesis-of-entamoeba-histolytica)

3.1.1.3. Balantidióza

Balantidiózu způsobuje obrvený prvok *Balantidium coli*. Projevuje se jako infekce tlustého střeva a může být zaměnitelná s amebózou (Goodman *et al.*, 2011).

Balantidium coli je největší a jediný obrvený prvok parazitující na člověku, který obvykle napadá tlusté střevo. Cysty se dostanou do těla kontaminovanou potravou nebo vodou a k excystaci dochází pravděpodobně v tenkém střevě. Vzniklý trofozoit je poměrně velký, oválného tvaru, pokrytý krátkými ciliemi (Vasilakopoulou *et al.*, 2003). Díky ciliím je pohyblivý a může být vzácně příčinou hluboké ulcerace tlustého střeva. U jinak zdravých pacientů se občas objevuje nauzea, zvracení či bolesti břicha a průjem. Skutečná dyzentérie se vyskytuje pouze u zeslabených a podvyživených pacientů (Lincová *et al.*, 2007).

3.1.1.4. Trichomonóza

Trichomonóza je způsobena bičíkatým prvokem *Trichomonas vaginalis*. Tento organismus osídluje urogenitální trakt a způsobuje záněty pochvy u žen, méně často se také projevuje zánětem močové trubice u mužů (Goodman *et al.*, 2011).

Trichomonóza je nejčastější nevirové sexuálně přenosné onemocnění související s vysokou morbiditou. Na celém světě je ročně přibližně 180 milionů žen nakaženo prvokem *Trichomonas vaginalis*. Infekce může probíhat asymptomaticky nebo se projevuje závažnými záněty. Bez příznaků je infekce asi ve 25-50% případů, zatímco u symptomatické formy se vyskytuje vulvovaginitida, cervicitida a uretritida. To může být spojeno také s dysurií, dyspareurií a bolestí břicha. Bylo zjištěno, že trichomonóza je spojena s nepříznivým průběhem těhotenství, např. předčasným odtokem plodové vody, nízkou porodní váhou novorozence nebo potratem (Kaur *et al.*, 2008).

Vzhledem k tomu, že infekce obvykle vyvolává zánětlivou reakci vaginálního epitelu u žen a močové trubice u mužů, může trichomonóza usnadnit přenos viru HIV. Ve Spojených státech proběhla studie, která zkoumala přírůstek nových infekcí HIV v souvislosti s trichomonózou. Ukázalo se, že až 6,12% z odhadovaných 12 000 nových infekcí HIV za rok souvisí s touto protozoální infekcí (Chesson *et al.*, 2004).

3.1.2. Krevní a tkáňové protozoální infekce

Do této skupiny řadíme tzv. tropické protozoální infekce (leishmanióza a trypanosomóza), se kterými se v Evropě prakticky nemůžeme setkat ani v importovaných případech, protože závažnost těchto onemocnění jakékoli cestování postiženého jedince vylučuje (Lincová *et al.*, 2007).

Další skupinou jsou parazitózy, které se mohou vyskytovat i v Evropě. Patří sem toxoplazmóza, pneumocystóza a malárie (Lincová *et al.*, 2007).

3.1.2.1. Leishmanióza

Leishmanióza je parazitární infekce, která se vyvíjí po nákaze prvoky rodu *Leishmania*, jež jsou přenášeny na člověka drobnými komáry rodu *Phlebotomus* (Lincová *et al.*, 2007). *Leishmania* způsobuje protozoální zoonózy u člověka a zvířat (Piscopo *et al.*, 2007).

Existují čtyři druhy leishmanií, které jsou patogenní pro člověka. *Leishmania donovani* způsobuje viscerální leishmaniózu. *Leishmania tropica* a *Leishmania major* způsobuje kožní leishmaniózu a *Leishmania braziliensis* způsobuje jihoamerickou mukokutánní leishmaniózu (Lincová *et al.*, 2007).

Viscerální leishmanióza se projevuje horečkou, váhovým úbytkem, hepatosplenomegalií, lymfadenopatií a pancytopenií. Nápadným rysem mohou být pigmentace kůže (toto onemocnění je známé i pod názvem kala-azar, neboli černá horečka) (Piscopo *et al.*, 2007). Jde o systémové horečnaté onemocnění, které, pokud není léčeno, končí většinou smrtí na interkurentní infekci (Lincová *et al.*, 2007).

Kožní leishmanióza zůstává v místě vstupu infekce, kde vznikají kožní vředy, které se hojí znetvořujícími jizvami (Lincová *et al.*, 2007).

Jihoamerická leishmanióza se většinou projevuje ulceracemi sliznic v nose, ústech a laryngu a ulceracemi kůže (Lincová *et al.*, 2007). Je zde velké riziko sekundární infekce, která může být příčinou mortality (Piscopo *et al.*, 2007).

Velkým problémem je ko-infekce leishmaniózy a viru HIV. Leishmanióza u HIV pozitivních pacientů je spojena s vysokým procentem relapsů a horší prognózou (Piscopo *et al.*, 2007).

3.1.2.2. Trypanosomóza

Africká trypanosomóza je způsobena prvoky rodu *Trypanosoma* a k přenosu dochází slinami mouchy tse-tse (Lincová *et al.*, 2007). Časná fáze infekce je charakterizována nálezem parazitů v krvi a lymfě bez vlivu na CNS. Následuje fáze, ve které se vyskytuje postižení CNS. K příznakům patří horečka, lymfadenopatie, splenomegalie a občasná myokarditida, která vyplývá ze systémového šíření parazitů. Existují dva druhy africké trypanosomózy: trypanosomózu východní Afriky způsobuje *T. brucei rhodesiense* a trypanosomóza západní Afriky je způsobená *T. brucei gambiense* (Goodman *et al.*, 2011). Rhodézská forma je akutní onemocnění, které většinou rychle končí smrtí, oproti formě gambijské, při které je průběh nemoci podstatně delší (Lincová *et al.*, 2007).

Americká trypanosomóza, neboli Chagasova nemoc, je zoonotická infekce, kterou způsobuje *Trypanosoma cruzi* (Goodman *et al.*, 2011). Vektorem onemocnění v tomto případě není moucha, ale ploštice rodu *Triatoma*. Projevuje se postižením trávicího ústrojí a pak i myokardu. Pokud není choroba včas léčena, je postižení myokardu (kardiomyopatie) většinou smrtelné (Lincová *et al.*, 2007).

Relaps onemocnění se může znovu vyskytnout u pacientů s oslabenou imunitou, kteří prodělali transplantaci orgánů nebo u pacientů s další infekcí (leukémie, AIDS) (Goodman *et al.*, 2011).

3.1.2.3. Toxoplazmóza

Toxoplazmóza je zoonotické kosmopolitní infekční onemocnění vyvolané intracelulárním prvokem *Toxoplasma gondii*. Ačkoli konečným hostitelem je kočka, tkáňové cysty byly nalezeny u různých druhů savců. U člověka se může rozvinout infekce

požitím nedovařeného masa obsahující tkáňové cysty, požitím zeleniny pocházející z půdy, která obsahuje infekční cysty, přímým kontaktem s výkaly koček obsahujících oocysty nebo transplacentárním přenosem na plod z infikované matky (Goodman *et al.*, 2011).

Toxoplazmóza způsobuje encefalitidu a další závažná systémová onemocnění u imunosuprimovaných osob. Pokud se onemocnění přenáší transplacentárně, může způsobit poškození mozku a očí u dítěte. Dříve než byla kolem roku 1980 zaznamenána první infekce virem HIV, neurologická toxoplazmóza se u dospělých vyskytovala jen vzácně a byla spojena především s pacienty s rakovinným onemocněním nebo po transplantaci. Později začalo docházet v mnoha případech k reaktivaci onemocnění v důsledku snížení funkce imunitního systému kvůli nákaze virem HIV (Jones *et al.*, 2012).

3.1.2.4. Pneumocystóza

Pneumocystóza, resp. pneumocystová pneumonie, je způsobena mikroorganismem nejasného taxonomického zařazení, patrně se jedná o mikromycetu (Lincová *et al.*, 2007).

Jde o závažné respirační onemocnění, které postihuje pacienty s poruchou imunity, především HIV pozitivní, dále pacienty užívající imunosupresivní léčbu nebo protinádorovou chemoterapii. Tato infekce vedoucí k selhání dýchacích funkcí je způsobena organismem *Pneumocystis jirovecii* (Villegas *et al.*, 2012).

Dalším druhem je *Pneumocystis carinii* infikující potkany. Tento patogen je důležitý především pro studium patogeneze pneumocystózy (Villegas *et al.*, 2012).

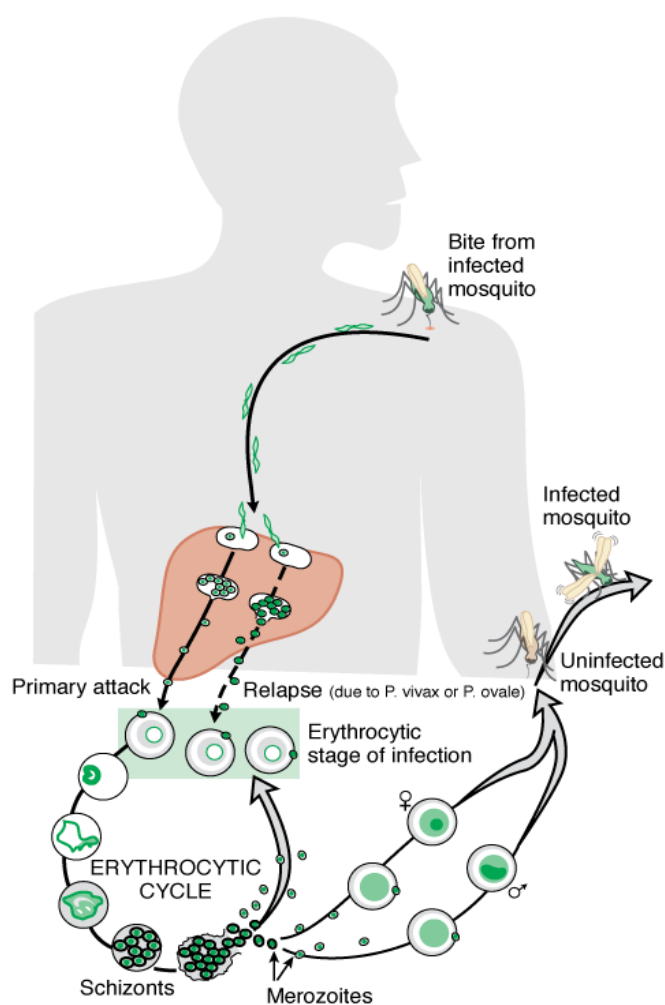
3.1.2.5. Malárie

Malárie je parazitární onemocnění, které je endemické převážně v tropických oblastech, kde je vysoká teplota a vlhkost. Tyto podmínky zajišťují vektoru choroby, komáru rodu *Anopheles*, normální existenci a rozmnožování (Lincová *et al.*, 2007).

Původcem onemocnění je jednobuněčný prvek rodu *Plasmodium*. Je známo pět druhů, které infikují člověka: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum*, *P. malariae* a *P. knowlesi*

(Goodman *et al.*, 2011). První dvě plazmodia způsobuje tzv. benigní terciánu, *P. falciparum* maligní terciánu, která je nejzávažnějším typem malárie a je zodpovědná za 90 % všech úmrtí na malárii, *P. malariae* pak způsobuje tzv. kvartánu (Lincová *et al.*, 2007). U *P. knowlesi* se dříve předpokládalo, že infikuje pouze primáty. Nyní se zjistilo, že jde o zoonózu způsobující malárii i u člověka zejména v oblasti jihovýchodní Asie (Goodman *et al.*, 2011). Vývojový cyklus plasmodií je znázorněn na obr. 2.

Malárie je charakterizována periodickými akutními záchvaty, při kterých se vyskytuje horečka, třesavka, profúzní pocení, hepatosplenomegalie, anémie, abdominální bolesti a letargie (Lincová *et al.*, 2007).



Obr. 2: Vývojový cyklus malarických parazitů (Goodman *et al.*, 2011)

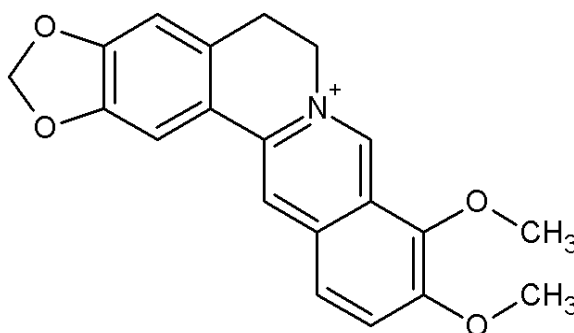
3.2. Testované látky

Berberin a palmatin patří mezi isochinolinové alkaloidy protoberberinového typu, které obsahují kvartérní dusík (Grycová *et al.*, 2007). Jejich soli jsou obvykle žluté a nachází se v rostlinách čeledi *Berberidaceae*, *Fumariaceae*, *Papaveraceae* a mnoha dalších (Marek *et al.*, 2003).

Papaverin je isochinolinový alkaloid benzyloisochinolinového typu nacházející se v opiu. Je známý především pro své spasmolytické účinky (Liu *et al.*, 2005).

Ornidazol je syntetická látka ze skupiny nitroimidazolových chemoterapeutik, která působí antibakteriálně a do jejich spektra účinků patří i některá protozoa (Hartl *et al.*, 2006).

3.2.1. Berberin



Obr. 3: Strukturní vzorec berberinu

Berberin je žlutý rostlinný isochinolinový alkaloid, který se nachází v kořenech, oddencích a kůře mnoha rostlin používaných jako rostlinná léčiva v tradiční čínské medicíně, např. *Hydrastis canadensis*, *Coptis chinensis*, a *Berberis sp.* V klinické praxi se obvykle používá ve formě berberin-chloridu nebo berberin-sulfátu. Z hlediska

farmakokinetiky se těžko vstřebává a je nestabilní v gastrointestinálním traktu (Ye *et al.*, 2009).

K vedlejším účinkům po podání berberinu patří gastrointestinální obtíže, dušnost, snížený krevní tlak, srdeční poškození a příznaky podobné chřipce. V těhotenství může dojít ke kontrakcím dělohy a potratu (Imanshahidi *et al.*, 2008).

Berberin představuje jeden z nejvíce prostudovaných rostlinných alkaloidů (Imanshahidi *et al.*, 2008). Bylo prokázáno množství jeho příznivých účinků na léčbu kardiovaskulárních chorob, diabetu, hyperlipidémie, rakoviny, průjmu, Alzheimerovy choroby a dalších onemocnění. Kromě toho má antiagregační, antivirovou, antibakteriální a imunostimulační aktivitu (Bhutada *et al.*, 2010). Z protozoálních infekcí byla potvrzena účinnost *in vitro* proti parazitům *Entamoeba histolytica* a *Plasmodium falciparum* (Wright *et al.*, 2000).

Předpokládá se, že antibakteriální účinnost berberinu souvisí s více mechanismy účinku. Jedním z nich je interkalace (vmezeření) mezi vlákna bakteriální DNA (Cowan, 1999). Dále bylo zjištěno, že berberin při dosažení MIC inhibuje schopnost bakterie *Streptococcus pyogenes* adherovat k epiteliálním hostitelským buňkám a zastavuje buněčný růst (Sun *et al.*, 1988).

Studie rostlin obsahujících berberin zjistila silnější antibakteriální aktivitu berberinu proti oportunním bakteriím způsobujícím onemocnění kůže a bakteriím, které způsobují bolest v krku, než proti gramnegativním bakteriím. To podporuje tradiční použití berberinu při hojení ran a na zklidnění při menším podráždění úst a krku (Villinski *et al.*, 2003).

Protizánětlivý účinek berberinu je způsoben inhibicí prostaglandinů (Kuo *et al.*, 2004). Tím se částečně vysvětluje i jeho protinádorová aktivita, protože berberin je inhibitor cyklooxygenázy-2, která se podílí i na vzniku nádorových buněk (Fukuda *et al.*, 1999).

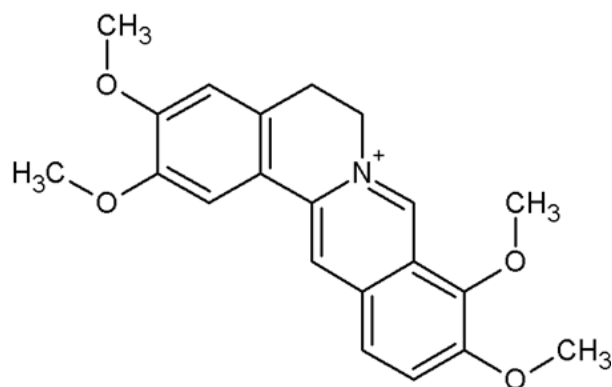
Další studie se zabývala antimykotickou aktivitou berberinu a jeho synergickým působením s amfotericinem B proti šíření kandidózy způsobené *Candida albicans* na zvířecích modelech. Přestože účinek samotného berberinu nebyl tak efektivní, v kombinaci s amfotericinem B umožnil snížit dávku amfotericinu B až o 75%. To je velmi výhodné z hlediska nežádoucích účinků amfotericinu B, jehož podání ve vysokých dávkách způsobuje poškození ledvin (Han *et al.*, 2005).

Berberin také chrání neurony před poškozením vyvolaným ischemií. Kromě toho má řadu dalších neurologických účinků, např. zlepšení paměti a učení, působí antidepressivně

a anxiolyticky. Má velký potenciál k léčbě onemocnění souvisejících s nervovým systémem, ale je potřebný ještě další výzkum (Ye *et al.*, 2009).

Na zvířecím modelu Alzheimerovy choroby byly testovány účinky berberinu. Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění projevující se snížením kognitivních funkcí. Je to nejčastější forma demence, která postihuje asi 5% lidí starších 65 let. V mozku dochází k ukládání patologických proteinů, které vytváří amyloidové plaky. Hromadí se zde mediátory zánětu (např. interleukin-1 β , interleukin-6), které poškozují neurony. Také dochází k úbytku acetylcholinu. U berberinu bylo pozorováno výrazné zlepšení prostorové orientace, ale na druhou stranu po aplikaci berberinu došlo ke zvýšení zánětlivých mediátorů (Zhu *et al.*, 2006).

3.2.2. Palmatin



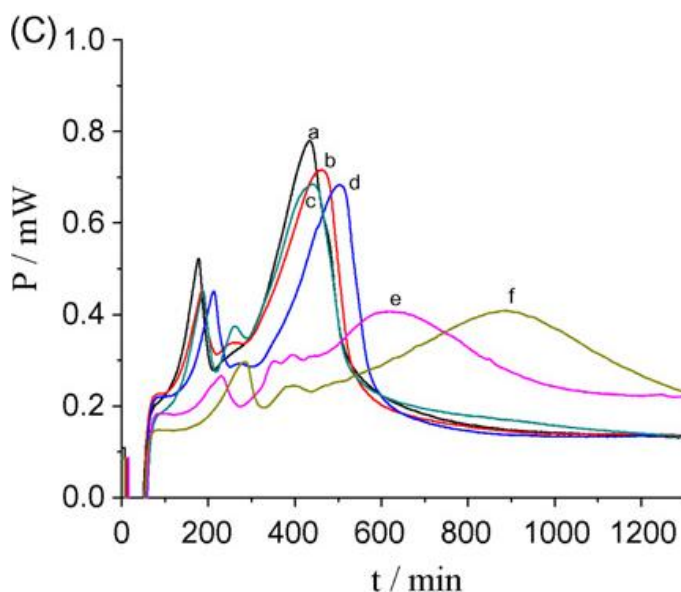
Obr. 4: Strukturní vzorec palmatinu

Palmatin je isochinolinový alkaloid protoberberinového typu strukturně blízký berberinu (Giri *et al.*, 2006). Je to bioaktivní složka izolovaná z rostliny *Enantia chlorantha* nebo kořenů a oddenků dalších rostlin, např. rodu *Coptis*, *Phellodendron*, *Tinospora*, které se používají v tradiční medicíně (Lee *et al.*, 2010). Tyto rostliny obsahují kromě palmatinu další protoberberinové alkaloidy (berberin, coptisin, epiberberin, jatrorrhizin). V mnoha

studiích je testován celý rostlinný materiál obsahující směs alkaloidů a poměrně málo z nich se zabývá aktivitou jednotlivých složek (Fan *et al.*, 2008).

Palmatin má obdobné spektrum účinků jako berberin. Byla u něj prokázána aktivita antibakteriální, antimykotická, antivirová, antipyretická a protizánětlivá (Lee *et al.*, 2010).

Na základě zjištění, že berberin vykazuje významnou antibakteriální aktivitu proti *Staphylococcus aureus*, byla porovnávána *in vitro* inhibiční aktivita dalších alkaloidů. Podle růstové křivky se ukázalo, že palmatin také inhibuje růst *Staphylococcus aureus*, ale má menší inhibiční účinek než berberin ($IC_{50} = 67 \mu\text{m/ml}$ u berberinu a $IC_{50} = 119 \mu\text{m/ml}$ u palmatinu) (Fan *et al.*, 2008). Působení různých koncentrací palmatinu na růst bakterie znázorňuje obr. 5.



Obr. 5: Růstová křivka *Staphylococcus aureus* při působení různých koncentrací palmatinu, ((a) kontrola, (b) 20 µg/ml, (c) 30 µg/ml, (d) 50 µg/ml, (e) 90 µg/ml, (f) 130 µg/ml) (Fan *et al.*, 2008)

Antimikrobiální aktivita závisí na struktuře zkoušených látek. Jednotlivé isochinolinové alkaloidy mají různé substituenty na C2, C3, C9 a C10 fenylových kruhů. Obecně platí, že sloučeniny nesoucí na uhlících C2 a C3 methylenedioxy funkční skupinu (např. berberin),

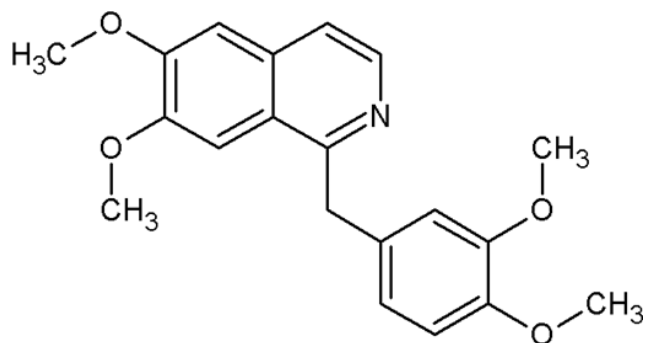
mají větší aktivitu než ty, které mají na stejných pozicích methoxy skupinu (palmatin). Na druhou stranu není významný rozdíl v antimikrobiální aktivitě mezi methylenedioxy a methoxy skupinami na uhlících C9 a C10 (Yan *et al.*, 2008).

Palmatin působí inhibici růstu i dalších bakterií. Byla zjištěna větší aktivita proti gramnegativním bakteriím (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) než proti grampozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*) (Orhan *et al.*, 2006).

Byla také testována účinnost palmatinu proti viru západonilské horečky (West Nile virus). Západonilský virus z čeledi *Flaviviridae* je přenášen komáry rodu *Culex*. Ačkoli hlavním hostitelem jsou ptáci, virus se může přenést i na savce, včetně člověka. Průběh je většinou asymptomatický nebo se objevují příznaky podobné chřipce. U méně než jednoho procenta infikovaných dochází k vážným projevům onemocnění, jako je encefalitida, meningitida, svalová slabost nebo obrna (Kramer *et al.*, 2007). Antivirotická aktivita palmatinu spočívá v inhibici virové proteázy, která štěpí virové proteiny za vzniku funkčních virových jednotek. (Jia *et al.*, 2010).

Palmatin izolovaný z kůry *Enantia chlorantha* byl zkoumán z hlediska *in vitro* inhibiční aktivity na prvocích *Trypanosoma cruzi* a *Leishmania infantum*. Společně s ním byly testovány i dva syntetické deriváty palmatinu, 8-hydroxydihydropalmatin a 8-cyanodihydropalmatin. Významný byl inhibiční účinek palmatinu na *T. cruzi*. Palmatin byl téměř 6x účinnější než nifurtimox, který byl použit jako referenční látka. Naopak inhibice *L. infantum* byla ve srovnání s *T. cruzi* asi 10x menší. Co se týká syntetických derivátů, inhibiční aktivita 8-hydroxydihydropalmatinu byla přibližně stejná jako u nifurtimoxu a aktivita 8-cyanodihydropalmatinu byla až 20x nižší. Substituce palmatinu v poloze 8 by tedy mohla mít vliv na antiprotozoální účinek (Nkwengoua *et al.*, 2009).

3.2.3. Papaverin



Obr. 6: Strukturní vzorec papaverinu

Papaverin je benzyloisochinolinový alkaloid nacházející se především v rostlině *Papaver somniferum* (mák setý, *Papaveraceae*). V současné době se ale díky relativně jednoduché syntéze připravuje především synteticky (Unterlinner *et al.*, 1999). Působí vazodilatačním a spasmolytickým účinkem prostřednictvím inhibice fosfodiesteráz a následným zvýšením intracelulární hladiny cyklických nukleotidů cAMP a cGMP v buňkách hladkého svalstva. Navíc inhibuje vápníkové kanály v buněčných membránách a snižuje množství vápenatých iontů v buňkách (Liu *et al.*, 2005).

Bylo prokázáno, že papaverin je selektivní inhibitor fosfodiesterázy podtypu 10A. Tato fosfodiesteráza se nachází především v mozku v buňkách striata a ovlivňuje jejich aktivitu. Papaverin by se tedy mohl podílet na léčbě psychotických onemocnění (Siuciak *et al.*, 2006).

Jiní autoři naopak považují papaverin za neselektivní. Byla identifikována specifická fosfodiesteráza vyskytující se pouze u prvoka *Trypanosoma cruzi*. V hodnocení inhibiční aktivity papaverin prokázal stejný účinek proti fosfodiesteráze tohoto prvoka jako proti fosfodiesteráze savců (Kunz *et al.*, 2005).

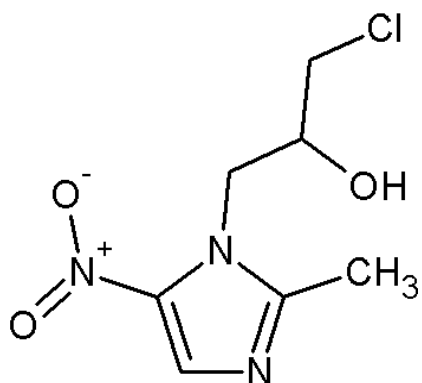
Papaverin je účinný v léčbě erektilní dysfunkce. Je aplikován pouze intrakavernózně v případech, kdy je perorální léčba kontraindikovaná nebo neúčinná. Většinou se používá v kombinaci s fentolaminem a prostaglandinem E₁. Při předávkování hrozí riziko priapismu

(dlouhotrvající bolestivá erekce, která nemizí ani po ejakulaci) a fibrózy kavernózních těles (Valentová *et al.*, 2004).

Díky svým spasmolytickým účinkům se může používat při léčbě dráždivého tračníku (Ehrmann, 2008) a různých dyspepsií (Ehrmann, 2009).

Intraarteriální infúze papaverinu účinně uvolňuje vazospasmus vzniklý následkem subarachnoidálního krvácení, zlepšuje průtok krve mozkem a okysličení mozkové tkáně. Jeho použití je ale omezeno nežádoucími účinky, zejména zvýšením intrakraniálního tlaku. V některých případech je účinek krátkodobý s rizikem recidivy (Liu *et al.*, 2005).

3.2.4. Ornidazol



Obr. 7: Strukturní vzorec ornidazolu

Ornidazol je substituovaný derivát 5-nitroimidazolu. Hlavní látkou této skupiny je metronidazol. Ornidazol vznikl zavedením lipofilní skupiny do molekuly metronidazolu a má tedy delší biologický poločas. Mechanismus účinku spočívá ve vazbě reaktivních meziproductů, které vznikají v mikroorganismu redukcí nitroskupiny v molekule ornidazolu na DNA. Následně způsobují smrt buňky (Hartl *et al.*, 2006).

Ornidazol působí antiprotozoálně a antibakteriálně hlavně proti anaerobním bakteriím. Jeho nežádoucí účinky jsou velmi mírné. Může se objevit bolest hlavy, nevolnost, sucho v ústech nebo kovová pachuť v ústech (Ogrendik, 2006).

Biodostupnost ornidazolu po perorálním podání je více než 90% a 11-13% se váže na plasmatické bílkoviny. Doba, za kterou je dosaženo maximální koncentrace v plasmě se pohybuje od dvou do čtyř hodin (Lamp *et al.*, 1999).

Byla zjištěna účinnost ornidazolu proti infekci způsobené střevním bičíkatým prvokem *Dientamoeba fragilis*. Ve srovnání s běžně používaným metronidazolem vykazuje ornidazol méně nežádoucích účinků a díky delšímu biologickému poločasu je možné ho podávat v jedné denní dávce, což zlepšuje compliance pacienta. To je obzvlášť důležité u starších lidí a dětí (Kurt *et al.*, 2008).

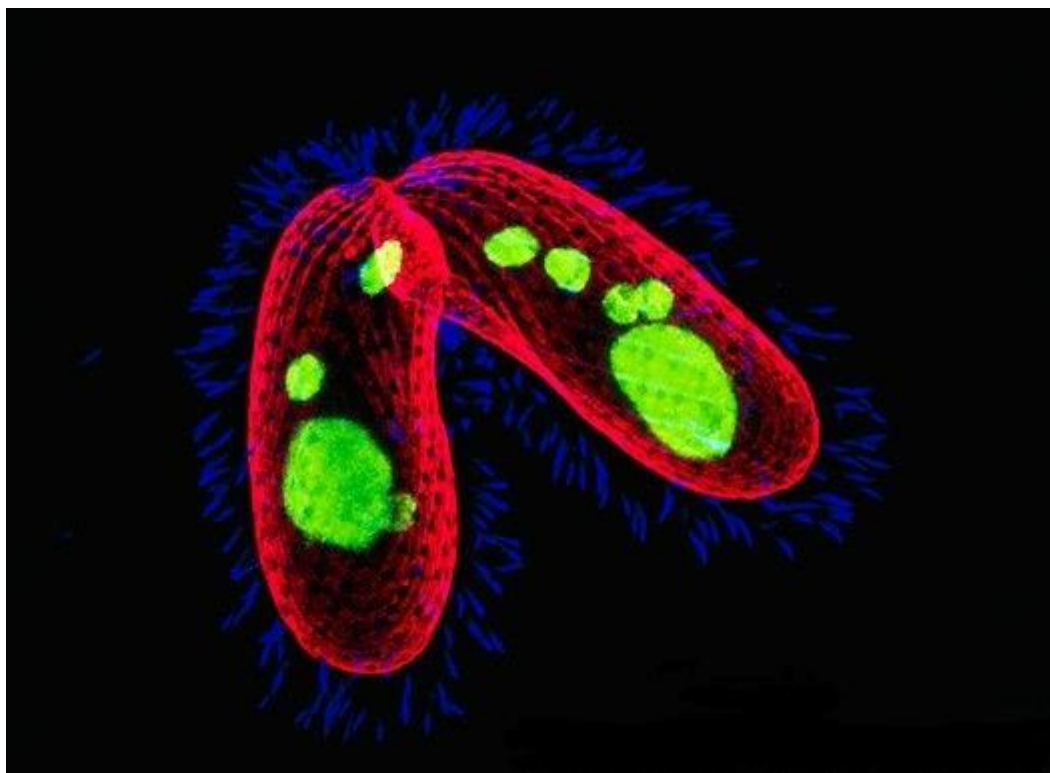
Ornidazol byl také hodnocen z hlediska klinické účinnosti, bezpečnosti a snášenlivosti u pacientů s aktivní revmatoidní artritidou. Revmatoidní artritida je chronické, zánětlivé a systémové onemocnění. Byla provedena randomizovaná, dvojitě zaslepená a placebem kontrolovaná studie s celkem 160 pacienty rozdělených do tří skupin. První skupině bylo podáváno perorálně 1000 mg ornidazolu, druhé skupině 500 mg a třetí skupině placebo po dobu tří měsíců. Léčba ornidazolem byla spojena s výrazným snížením bolestivosti, došlo ke zlepšení ranní ztuhlosti a celkově kvality života. Lepší výsledky byly zaznamenány u dávky 1000 mg ornidazolu. Terapie měla také pozitivní vliv na laboratorní testy (nižší hodnota sedimentace erytrocytů a hladina C-reaktivního proteinu). Ornidazol byl zároveň dobře snášen. Nežádoucí účinky byly hlášeny ve stejné nebo ještě menší míře než u placeba (Ogrendik, 2006).

Antibakteriální aktivita ornidazolu byla potvrzena ve srovnávací studii derivátů nitroimidazolu podaných v jedné denní dávce při léčbě bakteriální vaginózy. Po čtyřech týdnech léčby vykazoval ornidazol úspěšnost bezmála 98% oproti 80% při léčbě metronidazolem. Výhodou ornidazolu je jeho biologický poločas, který je delší než u metronidazolu a je důležitý z hlediska prevence recidivy. Naopak příliš dlouhý poločas některých derivátů se zdá nevýhodný, protože dochází i k narušení obranného mechanismu přirozené mikroflóry (Thulkar *et al.*, 2012).

Mezi nežádoucí účinky nitroimidazolů patří disulfiramová reakce. Při ní dochází k inhibici jaterního enzymu aldehyddehydrogenázy, je zablokován metabolismus ethanolu a zvyšuje se koncentrace acetaldehydu. Právě acetaldehyd je zodpovědný za klinické projevy. Může se vyskytnout úzkost, bolest hlavy, slabost, závratě, tachykardie, arytmie, zvracení a hypotenze. Ačkoli tento nežádoucí účinek je potvrzený pouze u metronidazolu,

byl zaznamenán i v souvislosti s užíváním ornidazolu. U pacienta užívajícího ofloxacin a ornidazol proti průjmu a zvracení se v kombinaci s alkoholem vyskytly zmíněné příznaky (Sharma *et al.*, 2009).

3.3. Testovaný organismus *Tetrahymena thermophila*



Obr. 8: *Tetrahymena thermophila*
(www.sciencephoto.com/media/365095/enlarge)

3.3.1. Taxonomické zařazení

Doména: *Eukaryota*

Eukaryota představuje velkou skupinu jednobuněčných a mnohobuněčných organismů. Nejdůležitějším znakem všech eukaryot je kompartmentace, tj. rozdělení prostoru buňky na jednotlivé segmenty oddělené membránou, které se liší funkcí a chemickým složením. Další charakteristikou je cytoskelet, který zajišťuje udržování tvaru buňky, lokomoci, nitrobuněčný transport a buněčné dělení (Hausmann *et al.*, 2003).

Říše: *Chromalveolata*

Tato velmi rozmanitá skupina zahrnuje podskupiny s radikálními rozdíly ve způsobu výživy, buněčných typech a struktuře (Keeling, 2009).

Podříše: *Alveolata*

Zahrnuje tři velké skupiny *Ciliophora* (nálevníci), *Apicomplexa* (výtrusovci) a *Dinoflagellata* (obrněnky), které tvoří společný monofyletický taxon. Původně se předpokládalo, že se jejich strukturální celky vyvinuly nezávisle na sobě. Nyní se zdá, že jsou tyto útvary odvozené ze společného předchůdce (Hausmann *et al.*, 2003), který měl mimo jiné dva heterokontní (odlišné) bičíky. Obdobné bičíky se vyskytují u dnešních obrněnek a gamet výtrusovců (Šifner, 2004).

Kmen: *Ciliophora* (nálevníci)

Patří sem volně žijící i parazitické druhy. Volně žijící nálevníci se běžně vyskytují ve vodě a vlhkém prostředí. Tyto vodní druhy jsou důležitou součástí potravních řetězců a mnohé z nich jsou využívány jako bioindikátory znečištění (Sedlák, 2002).

Pro nálevníky charakteristická buňka pokrytá specifickými pohybovými organelami, brvami (cilie), které se svojí stavbou podobají bičíkům. Tyto organely nebo jejich modifikace (např. membranely vzniklé splynutím krátkých příčných řad brv) slouží kromě pohybu i k přihánění potravy (Sedlák, 2002).

Nálevníci se vyznačují komplikovanou stavbou buněčného pokryvu vytvářejícího kortex. Součástí kortexu jsou mimo jiné kinetodesmální fibrily (stažitelná vlákna napojená na báze cilií) a složitý systém mikrotubulů seřazených do svazků. Tento systém mikrotubulů a fibril se souhrnně označuje jako infraciliatura a umožňuje změnu tvaru buňky (Sedlák, 2002).

U nálevníků se vyskytuje nejlépe vyvinutý komplex potravních organel tvořený buněčnými ústy, okolo kterých jsou seřazeny brvy nebo membranely přihánějící potravu. Následuje trychtýřovitý hltan, na jehož konci se odškrubují potravní vakuoly, které

se nakonec vyprazdňují a odstraňují nestrávené zbytky potravy na místě označovaném jako buněčná řiť (Sedlák, 2002).

Dalším nápadným znakem nálevníků je přítomnost heterokaryotických jader. Vedle jednoho nebo více somatických jader (makronukleů), která jsou místem syntézy RNA a zajišťují normální metabolismus buňky, mají ještě jedno nebo více jader generativních (mikronukleů), kde dochází ke genetickým rekombinacím (Hausmann *et al.*, 2003).

Třída: *Oligohymenophorea* (chudoblanní)

Tato třída obsahuje nejrozšířenější a nejznámější druhy nálevníků vůbec. Název je odvozen z přítomnosti malého množství orálních polykinet (Hausmann *et al.*, 2003). Brvy buněčných úst se výrazně liší od brv somatických (Sedlák, 2002).

Pro životní cyklus je často typický polymorfismus. Postupně se během vývoje mohou objevovat trofonti (jedinci přijímající potravu), tomonti (encystovaní trofonti připravení k dělení), tomiti (buňky po dělení, nepřijímají potravu) a teronti (excystovaná migrující stadia) (Hausmann *et al.*, 2003).

Řád: *Hymenostomatida*

Hlavním znakem jsou jednoduché kinety u ústního aparátu a většinou i monokinetidální somatická ciliatura (Hausmann *et al.*, 2003).

Hymenostomatida mají širokou ekologickou valenci. Patří sem zástupci volně žijící i symbiotičtí (Hausmann *et al.*, 2003).

Čeleď: *Tetrahymenidae*

Rod: *Tetrahymena*

Rod *Tetrahymena* se vyznačuje rychlým množením a snadnou kultivací. Proto představuje zvláště oblíbený objekt pro fyziologické, biochemické a biologické výzkumy (Hausmann *et al.*, 2003).

Druh: *Tetrahymena thermophila*

3.3.2. Charakteristika

Tetrahymena thermophila je nepatogenní, volně žijící eukaryotický organismus široce rozšířený v přírodě. Živí se organickou hmotou a bakteriemi (Gerhardt *et al.*, 2010). Tělo je tvořeno obrvenou buňkou, která je asi 50 µm dlouhá a 20 µm široká. Je to nejznámější prvek využívaný při laboratorních výzkumech (Asai *et al.*, 2000).

3.3.3. *Tetrahymena thermophila* jako modelový organismus

Nálevník *Tetrahymena thermophila* představuje dobře známý modelový organismus v mikrobiologii a buněčné biologii. Ve srovnání s ostatními prvky má totiž *T. thermophila* velkou, dobře pozorovatelnou buňku. Další výhodou jeho používání je rychle množení a snadná kultivace v různých médiích. Při optimálních podmínkách vzniká nová generace za 3-7 hodin (Gerhardt *et al.*, 2010).

Protože je tento organismus citlivý na toxické látky, může se uplatnit také v toxikologických studiích (Gerhardt *et al.*, 2010).

Podobně jako *T. thermophila* se pro experimentální biologii využívá nálevník *T. pyriformis*. Na rozdíl od *T. thermophila* ale postrádá mikronukleus a neprobíhá u něj pohlavní rozmnožování. Proto se při laboratorních výzkumech využívá *T. thermophila*, u kterého lze díky schopnosti konjugace zkoumat problémy související s genetickou analýzou a vznikem mutací (Asai *et al.*, 2000). Tyto druhy vykazují i další rozdíly. Zatímco optimální teplota pro růst *T. pyriformis* je okolo 28 °C, *T. thermophila* roste nejlépe při teplotě 35 °C (Wheatley *et al.*, 1994).

T. thermophila byl první organismus, na kterém byly studovány telomery na buněčné úrovni. Telomery jsou struktury z DNA a proteinů, které stabilizují konce eukaryotických chromozomů a umožňují jejich úplnou replikaci. Právě nálevníci se stali díky jedinečnému

uspořádání makronukleového genomu vyhledávaným materiálem pro výzkum struktury telomer (Hausmann *et al.*, 2003).

3.3.4. Jádra, rozmnožování

T.thermophila se stejně jako ostatní nálevníci vyznačuje jaderným dualismem. Jeden nebo více malých mikronukleů plní úlohu zárodečné linie. Jsou haploidní, obsahují pět párů eukaryotických chromozomů a mohou se dělit mitoticky nebo meioticky (Eisen *et al.*, 2006). Naproti tomu jeden nebo více velkých, na DNA bohatých makronukleů zajišťujících vegetativní funkce viditelné chromozomy neobsahují. Jejich dělení bývá často nazýváno jako „amitóza“. Protože makronukleus se vždy vyvíjí z mikronukleu, jsou genomy obou typů jader vývojově těsně spjatý (Hausmann *et al.*, 2003).

Vegetativní rozmnožování příčným dělením se střídá s pohlavním rozmnožováním, tzv. konjugací. Při ní dochází k vytvoření cytoplazmatického můstku splynutím membrán dvou buněk. Makronukley v průběhu konjugace zanikají a mikronukley se dělí meiózou a několika mitotickými děleními na řadu haploidních jader. Většina z nich degeneruje a zachovají se pouze dvě, stacionární a migrující. Migrující jádra proniknou cytoplazmatickým můstkem do partnerské buňky, kde splynou s jádrem stacionárním a vznikne diploidní synkaryon. Z něj se pak po oddělení buněk obnoví původní sada mikronukleů a makronukleů (Hausmann *et al.*, 2003).

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V této části je popsána použitá metoda k hodnocení inhibičních účinků testovaných látek, použité pomůcky, přístroje, chemikálie a postup vlastního provedení a hodnocení testu.

4.1. Popis metody

Ke zjištění antiprotozoální aktivity byl použit **vícegenerační test** s nálevníkem *Tetrahymena thermophila*. Název souvisí se schopností tohoto nálevníka vytvořit během 24 hodin 5-6 nových generací. Tento test je založen na přeměně substrátu (potravy) v biomasu tetrahymeny. Normální proliferující buněčná kultura spotřebuje substrát a vyjasní suspenzi, zatímco vlivem látek inhibujících růst, k úbytku potravy a vyjasnění suspenze nedochází (Protoxkit FTM, 1998).

Po 24 hodinách se změřením optické hustoty zákalu vyhodnotí inhibiční aktivita zkoumaných látek. Pro ověření správného provedení testu a citlivosti testovaného organismu se používá dichroman draselný (Protoxkit FTM, 1998).

4.2. Pomůcky, přístroje, chemikálie

4.2.1. Použité pomůcky

Zkumavky se zábrusem

Stojan na zkumavky

Eppendorfovy zkumavky

Laboratorní lžičky

Váženky

Kádinky

Automatické mikropipety a špičky
96jamková mikrotitrační destička
Ochranné rukavice

4.2.2. Použité přístroje

Analytické digitální váhy KERN ABJ
Třepačka VORTEX-GENIE 2
Ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P BANDELIN
Box s laminárním prouděním AURA 2000 M.A.C.
Inkubátor AQUALYTIC
Reader ANTHOS 2010
Počítač

4.2.3. Použité chemické látky

Berberin chlorid ($M_r=371,83$) Sigma-Aldrich
Palmatin chlorid hydrát ($M_r=405,70$) Sigma-Aldrich
Papaverin hydrochlorid ($M_r=375,85$) Český lékopis 2005, Doplněk 2006 a Doplněk 2007, Grada 2007
Ornidazol ($M_r=219,6$) Sigma-Aldrich
Proteose-pepton Fluka
Dichroman draselný
Deionizovaná voda
Láh (k povrchové desinfekci)

4.3. Vlastní provedení testu

4.3.1. Postup přípravy

Na analytických vahách byly naváženy testované látky a rozpuštěním v deionizované vodě byly připraveny roztoky těchto látek. V případě nižší rozpustnosti byla použita ultrazvuková vodní lázeň.

Dvojkovým ředěním byla připravena koncentrační řada testovaných roztoků o 10 postupně klesajících koncentracích pro každou zkoumanou látku. Nejvyšší koncentrace byla 2,5 mmol/l u berberinu, palmatinu a papaverinu, resp. 5 mmol/l u ornidazolu, viz tabulka 1.

Tabulka 1: Koncentrace testovaných látek v jednotlivých roztocích

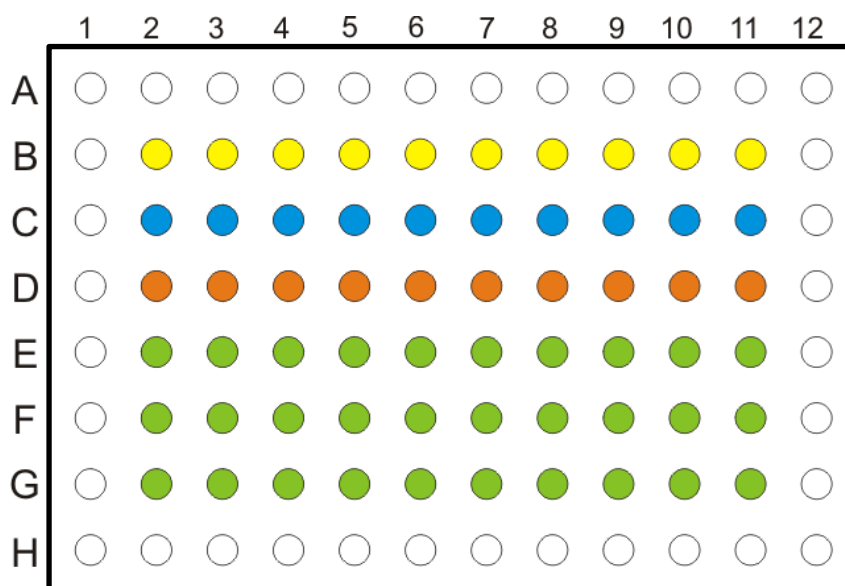
Roztok č.	Koncentrace berberinu [mmol/l]	Koncentrace palmatinu [mmol/l]	Koncentrace papaverinu [mmol/l]	Koncentrace ornidazolu [mmol/l]
1.	2,5	2,5	2,5	5,0
2.	1,25	1,25	1,25	2,5
3.	0,625	0,625	0,625	1,25
4.	0,313	0,313	0,313	0,625
5.	0,156	0,156	0,156	0,313
6.	0,078	0,078	0,078	0,156
7.	0,039	0,039	0,039	0,078
8.	0,020	0,020	0,020	0,039
9.	0,010	0,010	0,010	0,020
10.	0,005	0,005	0,005	0,010

V boxu s laminárním prouděním byly do mikrotitrační destičky dávkovány tyto složky:

- 1,5% pepton s přidavkem kvasničného extraktu (živné médium)
- jednotlivé roztoky testovaných látek
- suspenze *Tetrahymena thermophila*, která byla 24 hodin před začátkem experimentu přeočkována ze zásobní kultury do zkumavky

Sloupce 2 - 11 v řadách B - G byly plněny podle následujícího schématu (viz také obr. 9) :

- řada B: 150 μ l peptonu
- řada C: 100 μ l peptonu + 50 μ l roztoku testované látky (dávkováno postupně od nejvyšší koncentrace k nejnižší)
- řada D: 100 μ l peptonu + 50 μ l suspenze *Tetrahymena thermophila* (kontrola)
- řady E - G: 50 μ l peptonu + 50 μ l roztoku testované látky + 50 μ l suspenze *Tetrahymena thermophila* (3 paralelní měření)



Obr. 9: Schématické znázornění složek v mikrotitrační destičce

- pepton
- pepton + testovaná látka
- pepton + suspenze *Tetrahymena thermophila*
- pepton + testovaná látka + suspenze *Tetrahymena thermophila*
- prázdná jamka

Po naplnění destičky byla ihned změřena optická hustota pomocí readeru při vlnové délce 492 nm. Poté byla mikrotitrační destička umístěna do inkubátoru po dobu 24 hodin za nepřístupu světla a při teplotě 25 °C. Po uplynutí 24 hodin byla znovu odečtena optická hustota při stejné vlnové délce.

4.3.2. Vyhodnocení testu

Z odečtených hodnot optické hustoty v čase T_0 a T_{24} byla vypočítána procenta inhibice organismu *Tetrahymena thermophila* pro jednotlivé koncentrace testovaných látek.

K výpočtu byl použit vzorec:

$$\% \text{ inhibice} = \left(1 - \frac{\Delta OD(t)}{\Delta OD(k)} \right) \times 100$$

kde:

$\Delta OD(t)$ je rozdíl optických hustot v čase T_0 a T_{24} pro roztok testované látky

$\Delta OD(k)$ je rozdíl optických hustot v čase T_0 a T_{24} pro kontrolu

Tyto hodnoty sloužily k sestavení grafů závislosti procent inhibice tetrahymeny na koncentraci testovaných látek. Dále byly použity pro statistické zpracování a výpočet hodnoty $24hIC_{50}$.

5. VÝSLEDKOVÁ ČÁST

Po zpracování naměřených dat a výpočtu procentuální inhibice byly sestaveny grafy závislosti procent inhibice na koncentraci jednotlivých testovaných látek.

Každý experiment byl opakován nejméně třikrát a při každém výpočtu se vycházelo ze tří paralelních měření.

V grafech na obrázcích č. 10-13 jsou uvedena 3 opakování experimentu: stanovení A, stanovení B a stanovení C. U každého stanovení byla provedena 3 paralelní měření (viz řady E-G na obr. 9), z nichž byl vypočítán průměr, který je zaznamenán v tabulkách 2-5.

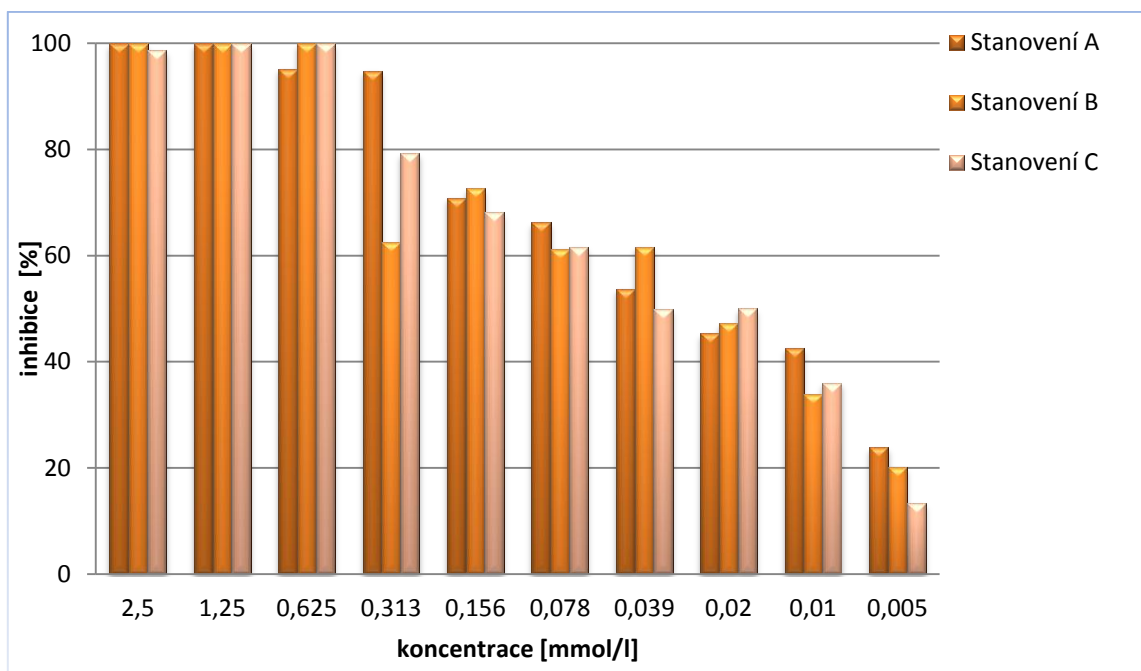
Pomocí statistického programu GraphPad Prism 5 Project byly stanoveny hodnoty střední inhibiční koncentrace $24hIC_{50}$ s 95% konfidenčními intervaly spolehlivosti.

Pro ověření správného průběhu testování byl před každým testem použit standardní toxin dichroman draselný, u kterého byla stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace $24hIC_{50} = 0,169 \text{ mmol/l}$ ($0,127\text{--}0,224 \text{ mmol/l}$).

5.1. Berberin

Tabulka 2: Procentuální inhibice berberinu u tří stanovení

Roztok č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stanovení A [%]	100	100	95,12	94,75	70,87	66,19	53,69	45,31	42,59	23,88
Stanovení B [%]	100	100	100	62,50	72,59	61,26	61,65	47,22	33,80	20,15
Stanovení C [%]	98,67	100	100	79,30	68,13	61,65	49,80	50,08	36,00	13,33



Obr. 10: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci berberinu

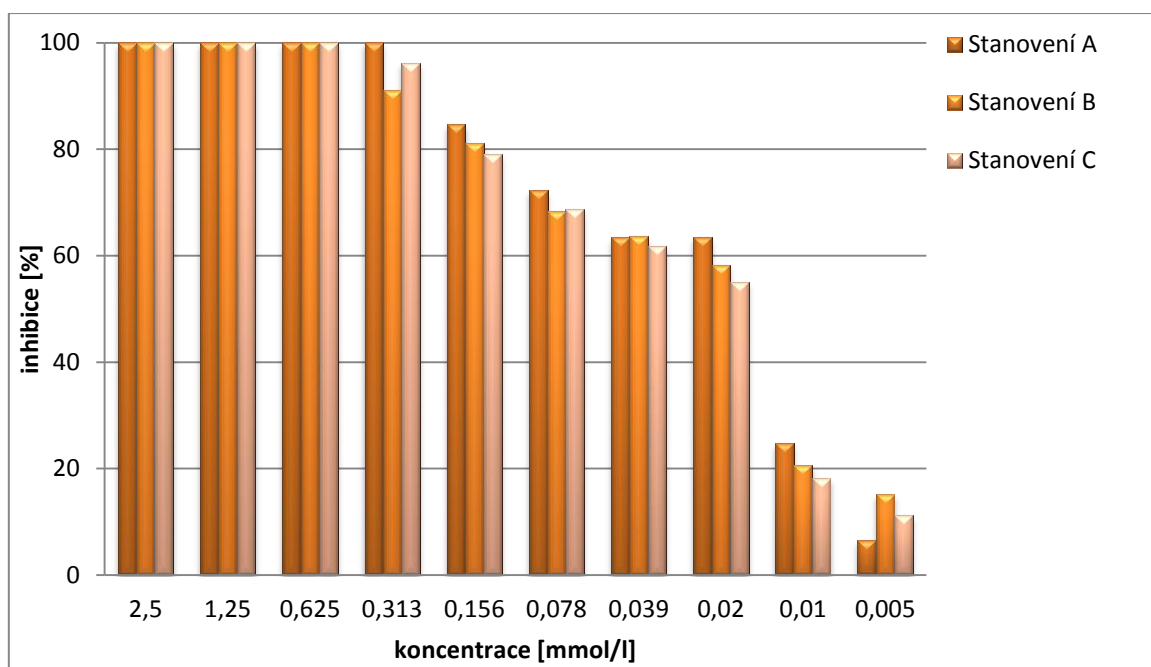
Hodnota střední inhibiční koncentrace berberinu:

$24hIC_{50} = 0,029 \text{ mmol/l}$ (0,014-0,063 mmol/l)

5.2. Palmatin

Tabulka 3: Procentuální inhibice palmatinu u tří stanovení

Roztok č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stanovení A [%]	100	100	100	100	84,63	72,19	63,41	63,41	24,75	6,50
Stanovení B [%]	100	100	100	91,00	81,11	68,26	63,64	58,22	20,50	15,15
Stanovení C [%]	100	100	100	96,18	78,98	68,65	61,80	55,00	18,18	11,23



Obr. 11: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci palmatinu

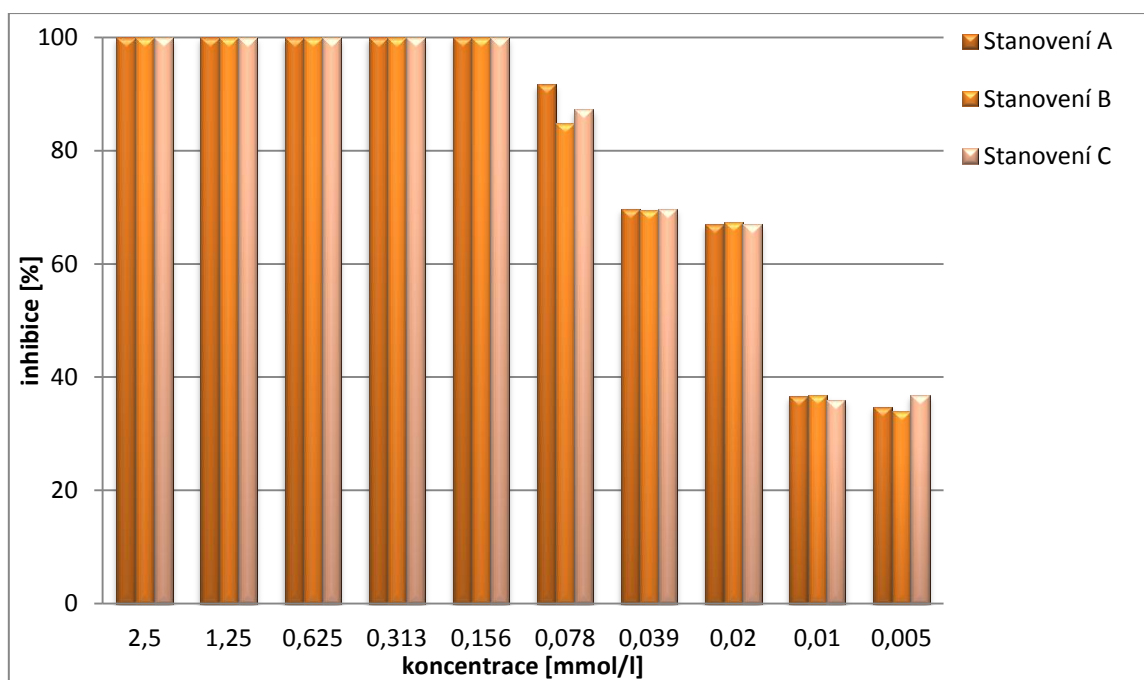
Hodnota střední inhibiční koncentrace palmatinu:

$24hIC_{50} = 0,024 \text{ mmol/l}$ (0,019-0,031 mmol/l)

5.3. Papaverin

Tabulka 4: Procentuální inhibice papaverinu u tří stanovení

Roztok č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stanovení A [%]	100	100	100	100	100	91,74	69,70	66,94	36,64	34,68
Stanovení B [%]	100	100	100	100	100	84,75	69,50	67,32	36,82	33,88
Stanovení C [%]	100	100	100	100	100	87,21	69,70	67,00	35,94	36,82



Obr. 12: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci papaverinu

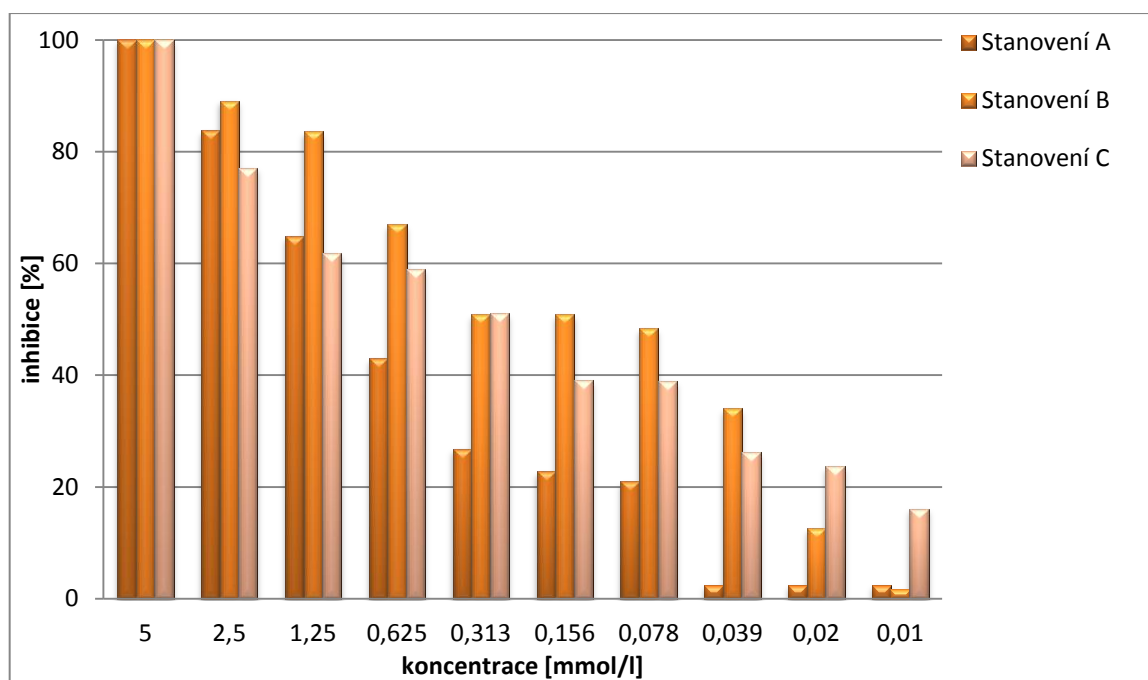
Hodnota střední inhibiční koncentrace papaverinu:

$24hIC_{50} = 0,012 \text{ mmol/l}$ (0,010-0,014 mmol/l)

5.4. Ornidazol

Tabulka 5: Procentuální inhibice ornidazolu u tří stanovení

Roztok č.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Stanovení A [%]	100	83,74	64,78	43,00	26,83	22,76	21,00	2,44	2,44	2,44
Stanovení B [%]	100	89,07	83,61	67,00	50,82	50,82	48,36	34,00	12,57	1,64
Stanovení C [%]	100	77,10	61,83	59,00	51,00	39,00	38,93	26,21	23,66	16,03



Obr. 13: Graf závislosti procentuální inhibice na koncentraci ornidazolu

Hodnota střední inhibiční koncentrace ornidazolu:

$24hIC_{50} = 0,313 \text{ mmol/l}$ (0,224-0,439 mmol/l)

6. DISKUSE

Přírodní látky jsou organické sloučeniny vznikající při chemických přeměnách v rostlinných buňkách. Vedle základních živin potřebných pro růst a vývoj rostlin produkují také látky, které pro rostliny nejsou nezbytné. Některé tyto látky se vyznačují léčivým účinkem a jsou tradičně využívány již dlouhá staletí. Jejich spektrum účinku zahrnuje především aktivitu antibakteriální, antimykotickou, antiparazitární a antivirovou. Díky těmto vlastnostem jsou přírodní látky předmětem rozsáhlých studií zkoumajících jejich účinnost (Kalemba *et al.*, 2003).

V medicíně jsou hojně využívány alkaloidy. Alkaloidy představují rozsáhlou skupinu sekundárních rostlinných metabolitů široce rozšířených v přírodě. Jsou to biologicky aktivní cyklické sloučeniny obsahující dusík (Grycová *et al.*, 2007).

V této diplomové práci byla sledována antiprotozoální aktivita přírodních látek, konkrétně alkaloidů berberinu, palmatinu a papaverinu v porovnání se syntetickým ornidazolem použitým jako standard antiprotozoálního účinku. Inhibiční aktivita látek byla testována na modelovém jednobuněčném organismu *Tetrahymena thermophila*.

V následující tabulce jsou uvedeny námi získané hodnoty střední inhibiční koncentrace $24hIC_{50}$ u jednotlivých látek.

Tabulka 6: Hodnoty střední inhibiční koncentrace testovaných látek

Látka	Hodnota $24hIC_{50}$ [mmol/l]
Berberin	0,029 (0,014-0,063)
Palmatin	0,024 (0,019-0,031)
Papaverin	0,012 (0,010-0,014)
Ornidazol	0,313 (0,224-0,439)

První testovanou látkou byl **berberin**. Vlastnosti tohoto alkaloidu byly studovány v četných studiích a bylo u něj prokázáno množství farmakologických účinků, i když většinou s nejasným mechanismem působení.

Vliv berberinu a dalších protoberberinových alkaloidů izolovaných z *Coptidis rhizoma* na růst *Tetrahymena thermophila* zkoumal pomocí mikrokalorimetrie Han a jeho kolektiv. Mikroorganismus byl kultivován v médiu obsahujícím pepton, vaječný extrakt a glukózu při 28 °C. Byla sledována růstová křivka prvoka při působení alkaloidu o koncentracích v rozmezí 0,075-0,75 mmol/l a stanovena hodnota střední inhibiční koncentrace berberinu $IC_{50}=0,333$ mmol/l (Han *et al.*, 2012).

Freiburghaus prokázal na prvoku *Trypanosoma brucei rhodesiense* značný inhibiční účinek berberinu. Po kultivaci, která probíhala 66 hodin při teplotě 37 °C, byla s využitím fluorescence stanovena hodnota $IC_{50}=1,1$ μ mol/l (Freiburghaus *et al.*, 1996).

Účinnost berberinu byla testována i na dalším druhu rodu *Trypanosoma* – na *Trypanosoma cruzi*. Jako médium bylo při experimentu použito teplem inaktivované sérum z krve telecích zárodků. Po 72 hodinách kultivace byly patogenní organismy obarveny a spočítány v Neubauerově komůrce. Výsledná hodnota IC_{50} v tomto případě činila 0,81 μ mol/l (Schinella *et al.*, 2007).

Berberin byl testován v podmínkách *in vitro* s prvokem *Plasmodium falciparum* a přinesl několik výsledků v různých studiích.

Iwasa sledoval působení berberinu na *P. falciparum* kultivovaného v inaktivovaných erytrocytech s přidavkem gentamicinu. Následovala kultivace spolu s roztoky berberinu o různých koncentracích při teplotě 37°C po dobu 72 hodin. Poté byli patogenní parazité obarveni roztokem a spočítáni pod mikroskopem. Hodnota $IC_{50}=0,27$ μ mol/l pak byla stanovena v porovnání s kontrolou, kdy inkubace média probíhala za stejných podmínek, ale bez přítomnosti testovaných látek (Iwasa *et al.*, 1998).

Další studii zabývající se inhibiční aktivitou berberinu u patogenních prvoků způsobujících malárii provedl Wright v roce 2000. Aktivita vůči *P. falciparum* byla stanovena měřením inhibice zabudovávání [³H]-hypoxantinu do červených krvinek nakažených tímto parazitem. Zde byla zjištěna hodnota $IC_{50}=1,1$ μ mol/l (Wright *et al.*, 2000).

Současně Wright studoval vliv berberinu také na *Entamoeba histolytica*. Různé koncentrace testované látky byly inkubovány v mikrotitrační destičce při 37 °C 72 hodin. Po odečtení optické hustoty při vlnové délce 490 nm činila výsledná hodnota $IC_{50}=122\text{ }\mu\text{mol/l}$ (Wright *et al.*, 2000).

V našem experimentu jsme získali hodnotu IC_{50} pro berberin 0,029 mmol/l. Tuto hodnotu můžeme porovnat s hodnotou $IC_{50}=0,333\text{ mmol/l}$, kterou ve své studii stanovil Han (2012). Experimenty byly provedeny na stejném modelovém organismu a se stejnou látkou, rozdíl byl v použité metodě. I když je naše hodnota asi 11x nižší, hodnoty dalších studií prováděných na konkrétních patogenních prvocích se pohybují až v řádech $\mu\text{mol/l}$.

Další testovanou látkou byl **palmatin**. Palmatin je alkaloid strukturně blízký berberinu. Oba tyto alkaloidy jsou obsaženy ve stejných rostlinných druzích a řada autorů porovnává jejich účinnost.

Působení palmatinu na růst *Tetrahymena thermophila* bylo sledováno ve studii, kterou prováděl Kong a kolektiv. Buňky *T. thermophila* byly nejprve kultivovány v inkubátoru při konstantní teplotě 28 °C. Poté byly vystaveny působení roztoku palmatinu o koncentracích v rozmezí 0,28-2,27 mmol/l. Následně byly s využitím mikrokolorimetru sestaveny růstové křivky *T. thermophila* a byl sledován vliv jednotlivých koncentrací alkaloidu. Ze získaných hodnot byla vypočítána procentuální inhibice růstu prvoka a jako IC_{50} zde byla zaznamenána hodnota 1,291 mmol/l (Kong *et al.*, 2009).

Další hodnota střední inhibiční koncentrace byla stanovena Hanem v rámci stejné studie, která sledovala vliv berberinu na růst *T. thermophila* (viz předchozí strana). Experiment probíhal za stejných podmínek s pomocí kalorimetrie a v tomto případě byla hodnota IC_{50} pro palmatin 0,156 mmol/l (Han *et al.*, 2012).

Ve studii s konkrétní patogenními organismy také projevil inhibiční účinek palmatinu. Nkwengoua a kolektiv sledovali efekt palmatinu izolovaného z rostliny *Enantia chlorantha*. Působení palmatinu rozpuštěném v dimethylsulfoxidu byly vystaveny 3 organismy: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* a *Leishmania infantum*. Jako

kultivační médium bylo použito sérum z krve telecích zárodků. Po inkubaci při teplotě 37 °C po dobu sedmi dní bylo provedeno spektrofotometrické vyhodnocení a vypočítána hodnota IC₅₀. Největší inhibiční aktivita byla zaznamenána u *T. cruzi* (IC₅₀=0,068 μmol/l), slabší aktivita byla u *L. infantum* (IC₅₀=0,79 μmol/l) a nejméně palmatin působil na *T. brucei* (IC₅₀=280 μmol/l) (Nkwengoua et al., 2009).

Při našem měření jsme získali hodnotu 24hIC₅₀ pro palmatin 0,024 mmol/l. Můžeme porovnat studii Konga (2009), kde kromě střední inhibiční koncentrace (1,291 mmol/l) zaznamenal i procenta inhibice pro jednotlivé koncentrace látky. Zde je uvedena 100% inhibice při koncentraci 2,27 mmol/l a při koncentraci 1,7 mmol/l je inhibice 71 %. Naproti tomu v této práci byla pozorována ještě při koncentraci 0,625 mmol/l 100% inhibice.

V pořadí třetí testovanou látkou byl **papaverin**. Tento alkaloid nemá na rozdíl od předchozích alkaloidů mnoho záznamů o testované antiprotozoální aktivitě.

Merchsjohann a kolektiv studovali účinek 34 různých alkaloidů, mezi nimiž byl i papaverin, na růst parazitů *Trypanosoma brucei* a *Trypanosoma congolense*. Krevní formy těchto patogenů byly kultivovány v médiu obsahujícím zárodečné hovězí sérum. Po smíchání média a roztoků různých koncentrací látky v mikrotitrační destičce byla směs 48 hodin inkubována. Poté proběhlo měření pomocí ELISA rearderu při 550 nm nebo počítání v Neubauerově komůrce. Výsledná hodnota IC₅₀ byla stanovena na 0,051 mmol/l (Merschjohann et al., 2001).

Papaverin známý jako inhibitor fosfodiesterázy byl sledován z hlediska jeho inhibičního účinku na konkrétní buněčnou strukturu-fosfodiesterázu prvoka *Trypanosoma cruzi*. Při tomto výzkumu byla zjištěna hodnota IC₅₀=25 μmol/l (Kunz et al., 2005).

Ačkoli u papaverinu nebyla ve velkém množství zkoumána jeho antiprotozoální aktivita, v tomto experimentu vykázal největší inhibiční účinek ze všech námi testovaných látek (IC₅₀=0,012 mmol/l).

Při vyšších koncentracích papaverinu byla pod mikroskopem patrná deformace jednotlivých buněk sledovaného prvoka. Tyto změny nebyly zaznamenány u žádné jiné

zkoumané látky, kde se inhibiční vliv alkaloidů projevoval pomalým nebo žádným pohybem mikroorganismů.

Hodnota $24IC_{50}$ pro papaverin byla stanovena na 0,012 mmol/l. V rozmezí koncentrací 2,5-0,156 mmol/l působil papaverin 100% inhibicí růstu *T. thermophila*.

Ornidazol, který byl v této práci použit ke srovnání inhibičního účinku testovaných alkaloidů, má prokázanou antiprotozoální aktivitu. V některých zemích se běžně používá v terapii protozoálních infekcí. V České republice byl registrován do roku 2010 pod obchodním názvem Avrazor® (www.sukl.cz).

Houk Kong a kolektiv sledovali inhibiční efekt ornidazolu v podmínkách *in vitro*. Při svém výzkumu použili trofozoity parazitického organismu *Giardia lamblia*. Po inkubaci a odečtení optické hustoty měla IC_{50} hodnotu 0,583 μ mol/l (Houk Kong *et al.*, 2011).

Ve starší studii z roku 1992 byl taktéž zkoumán vliv ornidazolu na prvoka *G. lamblia*. Při obdobných podmínkách bylo dosaženo podobných hodnot, v tomto případě byla IC_{50} 0,411 μ mol/l (Cedillo-Rivera *et al.*, 1992).

V této práci byl zaznamenán inhibiční vliv ornidazolu na *Tetrahymena thermophila* menší než u ostatních testovaných látek. Vypočítaná hodnota $24hIC_{50}$ pro ornidazol je 0,313 mmol/l. Koncentrace roztoku ornidazolu stejná jako zbývající zkoumané látky (tj. 2,5 mmol/l) nevykazovala 100% inhibici a proto byla maximální koncentrace zvolena větší (5 mmol/l).

Zájem o výzkum přírodních látek v poslední době stoupá také v důsledku vznikající rezistence patogenních mikroorganismů vůči běžně užívaným léčivům. Právě přírodní látky mohou být díky svým rozmanitým účinkům pro výzkum nových léčiv přínosem. Také je ale zde potřeba zhodnotit nežádoucí účinky a toxicitu.

7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo stanovení antiprotozoální aktivity přírodních látek. Testovány byly isochinolinové alkaloidy berberin, palmatin a papaverin. K porovnání sloužil derivát 5-nitroimidazolu ornidazol, který je standardně používán v terapii protozoálních infekcí.

V experimentu byl použit jednobuněčný modelový organismus *Tetrahymena thermophila*. Na tomto prvku bylo sledováno působení roztoků testovaných látek o různých koncentracích. Nejvyšší koncentrace v případě berberinu, palmatinu a papaverinu byla 2,5 mmol/l a 5 mmol/l v případě ornidazolu.

Do mikrotitrační destičky byly dávkovány roztoky testovaných látek, suspenze *Tetrahymena thermophila* a živné médium. Pomocí readeru byla změřena optická hustota ihned po naplnění a dále po 24 hodinách inkubace při vlnové délce 492 nm.

Z naměřených hodnot byla vypočítána procentuální inhibice a hodnota střední inhibiční koncentrace 24hIC₅₀ pro jednotlivé látky.

Získané hodnoty byly následující:

pro berberin	24hIC ₅₀ =0,029 mmol/l (0,014-0,063 mmol/l)
pro palmatin	24hIC ₅₀ = 0,024 mmol/l (0,019-0,031 mmol/l)
pro papaverin	24hIC ₅₀ = 0,012 mmol/l (0,010-0,014 mmol/l)
pro ornidazol	24hIC ₅₀ = 0,313 mmol/l (0,224-0,439 mmol/l)

Z uvedeného vyplývá, že největší inhibici růstu prvoka *T. thermophila* způsobil papaverin, dále inhibiční aktivita klesá v pořadí papaverin > palmatin > berberin. Všechny tyto látky vykazovaly větší inhibiční efekt než ornidazol použitý jako standard antiprotozoální aktivity.

8. VÝKLAD NĚKTERÝCH POJMŮ

Dyspareurie	druh sexuální poruchy projevující se bolestivou souloží
Ekologická valence	schopnost organismů přizpůsobit se určitému prostředí
Encystace	vytvoření cysty
Excystace	uvolnění prvoka z cysty
Kineta	podélně probíhající řada kinetid
Kinetida	základní jednotka bičíků a řasinek
Monofyletismus	stav skupiny organismů zahrnující příslušníky jediné fylogenetické linie
Nifurtimox	derivát 5-nitrofuranu, látka dříve užívána k léčbě Chagasovy nemoci, nyní v klinickém zkoušení pro léčbu africké trypanosomózy
Oocysta	vývojové stadium některých parazitujících prvoků vznikající v definitivních hostitelích
Polykineta	označení pro příústní membranely a jim podobné řasinkové útvary
Synkaryon	buněčné jádro vzniklé splynutím jader dvou různých buněk, (např. při konjugaci nálevníků nebo při kultivaci buněk <i>in vitro</i>)
Trofozoit	vegetativní forma prvoků
Zoonóza	onemocnění zvířat přenosné přirozenou cestou na člověka

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Asai D. J., Forney J. D., *Tetrahymena thermophila*, *Methods Cell Biol.* **62**, 2000, 580 s.

Bhutada P., Mundhada Y., Bansod K. *et al.*, Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice, *Epilepsy Behav.* **18**, 2010, s. 207-210.

Cedillo-Rivera R., Munoz O., In vitro susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents, *J Med Microbiol.* **37**, 1992, s. 221-224.

Cowan M. M., Plant products as microbial agents, *Clin Microbiol Rev.* **12**, 1999, s. 564-582.

Dawson D., Foodborne protozoan parasites, *Int J Food Microbiol.* **103**, 2005, s. 207-227.

Ehrmann J., Funkční dyspepsie, *Klin Farmakol Farm.* **23**, 2009, s. 35-41.

Ehrmann J., Současné možnosti terapie dráždivého tračníku, *Klin Farmakol Farm.* **22**, 2008, s. 99-102.

Eisen J. A., Coyne R. S., Wu M. *et al.*, Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote, *PLoS Biol.* **4**, 2006, s. 1620-1642.

Fan D., Xiao X., Ma X. *et al.*, Calorimetric study of the effect of protoberberine alkaloids in *Coptis chinensis* Franch on *Staphylococcus aureus* growth, *Thermochim Acta.* **480**, 2008, s. 49-52.

Freiburghaus F., Kaminsky R., Nkunya M. H. H. *et al.*, Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity, *J Ethnopharmacol.* **55**, 1996, s. 1-11.

Fukuda K., Hibiya Y., Mutoh M. *et al.*, Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells, *J. Ethnopharmacol.* **66**, 1999, s. 227-233.

Gerhardt A., Ud-Daula A., Schramm K. W., *Tetrahymena* spp. (Protista, Ciliophora) as test species in rapid multilevel ecotoxicity tests, *Acta Protozool.* **49**, 2010, s. 271-280.

Giri P., Hossain M., Kumar G. S. *et al.*, RNA specific molecules: Cytotoxic plant alkaloid palmatine binds strongly to poly (A), *Bioorg Med Chem Lett.* **16**, 2006, s. 2364-2368.

Goodman L., Brunton L., Chabner B. *et al.*, Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics 12th ed., 2011, s. 2084.

Grycová L., Dostál J., Marek R., Quaternary protoberberine alkaloids, *Phytochemistry.* **68**, 2007, s. 150-175.

Han Y., Yan D., Zhao Y. *et al.*, Toxic effects of protoberberine alkaloids from *Rhizoma Coptidis* on *Tetrahymena thermophila* BF5 growth based on microcalorimetry, *J Therm Anal Calorim.* **108**, 2012, s. 341-346.

Han H., Lee J., Berberine Synergy with Amphotericin B against Disseminated Candidiasis in Mice, *Biol Pharm Bull.* **28**, 2005, s. 541-544.

Hartl J., Doležal M., Miletín M. *et al.*, Farmaceutická chemie IV, 1. Vydání, Praha: Nakladatelství Karolinum 2006, 166 s.

Hausmann K., Hülsmann N., Protozoologie, Vyd. 1. Překlad Jiří Lom. Praha: Academia, 2003, 347 s.

Houk Kong K., Sawangjaroen N., Phongpaichit S., A colorimetric method for the evaluation of anti-giardial drugs *in vitro*, *Exp Parasitol.* **127**, 2011, s. 600-603.

Chesson H., Blandford J., Pinkerton S., Estimates of the Annual Number and Cost of New HIV Infections Among Women Attributable to Trichomoniasis in the United States, *Sex Transm Dis.* **31**, 2004, s. 547-551.

Imanshahidi M., Hosseinzadeh H., Pharmacological and therapeutic effects of *Berberis vulgaris* and its active constituent, berberine, *Phytother Res.* **22**, 2008, s. 999-1012.

Iwasa K., Kim H. S., Wataya Y. *et al.*, Antimalarial activity and structure – activity relationships of protoberberine alkaloids, *Eur J Med Chem.* **33**, 1998, s. 65-69.

Jia F., Zou G., Fan J. *et al.*, Identification of palmatine as an inhibitor of West Nile virus, *Arch Virol.* **155**, 2010, s. 1325-1329.

Jones J. L., Roberts J. M., Toxoplasmosis Hospitalizations in the United States, *Clin Infect Dis.* **54**, 2012, s. 58-61.

Kalembe D., Kunicka A., Antibacterial and antifungal properties of essential oils, *Curr Med Chem.* **10**, 2003, s. 813-829.

Kaur S., Khurana S., Bagga R. *et al.*, Trichomoniasis among women in North India: A hospital based study, *Indian J Sex Transm Dis.* **29**, 2008, s. 76-81.

Keeling P. J., Chromalveolates and the Evolution of Plastids by Secondary Endosymbiosis, *J Eukaryot Microbiol.* **56**, 2009, s. 1-8.

Kong W., Zhao Y., Xiao X. *et al.*, Action of palmatine on *Tetrahymena thermophila* BF5 growth investigated by microcalorimetry, *J Hazard Mater.* **168**, 2009, s. 609-613.

Kramer L. D., Li J., Shi P., West Nile virus, *Lancet Neurol.* **6**, 2007, s. 171-181.

Kunz S., Oberholzer M., Seebeck T., A FYVE-containing unusual cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*, *FEBS J.* **272**, 2005, s. 6412-6422.

Kuo C., Chi C., Liu T., The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Lett.* **203**, 2004, s. 127-137.

Kurt Ö., Girginkardesler N., Balcioglu I. C. *et al.*, A comparison of metronidazole and single-dose ornidazole for the treatment of dientamoebiasis, *Clin Microbiol Infec.* **14**, 2008, s. 601-604.

Lamp K. C., Freeman C. D., Klutman N. E. *et al.*, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the nitroimidazole antimicrobials, *Clin Pharmacokinet.* **36**, 1999, s. 353-373.

Lee J., Mase N., Yonezawa T. *et al.*, Palmatine Attenuates Osteoclast Differentiation and Function through Inhibition of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand Expression in Osteoblast Cells, *Biol Pharm Bull.* **33**, 2010, s. 1733-139.

Lincová D., Farghali H. *et al.*, Základní a aplikovaná farmakologie, druhé, doplněné a přepracované vydání, 2007, 627 s.

Liu J. K., Couldwell W. T., Intra-arterial papaverine infusions for the treatment of cerebral vasospasm induced by aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *Neurocrit care.* **2**, 2005, s. 124-132.

Lüllman H., Mohr K., Wehling M., Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání, 2004, 725 s.

Marek R., Sečkářová P., Hulová D. *et al.*, Palmatine and Berberine Isolation Artifacts, *J Nat Prod.* **66**, 2003, s. 481-486.

Merschjohann K., Sporer F., Steverding D. *et al.*, *In vitro* effect of alkaloids on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*, *Planta Med.* **67**, 2001, s. 623-627.

Nkwengoua E. T., Ngantchou I., Nyasse B. *et al.*, *In vitro* inhibitory effects of palmatine from *Enantia chlorantha* on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*, *Nat Prod Res.* **23**, 2009, s. 1144-1150.

Ogrendik M., Treatment of rheumatoid arthritis with ornidazole: a randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Rheumatol Int.* **26**, 2006, s. 1132-1137.

Orhan I., Özcelik B., Karaoglu T. *et al.*, Antiviral and Antimicrobial Profiles of Selected Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria* and *Corydalis* Species, *Z Naturforsch.* **62c**, 2006, s. 19-26.

Piscopo T., Azzopardi Ch. M., Leishmaniasis, *Postgrad Med J.* **83**, 2007, s. 649-657.

Protoxkit, F., Freshwater toxicity test with a ciliate protozoan. Standard Operational Procedure, Creasel, Deinze, Belgium, 1998, 18 s.

Sedlák E., Zoologie bezobratlých, 2., přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2002, 336 s.

Sharma V., Sharma A., Kumar V. *et al.*, Disulfiram-like reaction with ornidazole. *J Postgrad Med.* **55**, 2009, s. 292-293.

Schinella G., Tournier H., Zaidenberg A., *In vitro* and *in vivo* activity of berberine on the blood trypomastigote from *Trypanosoma cruzi*, *Biol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas.* **6**, 2007, s. 81-85.

Siuciak J. A., Chapin D. S., Harms J. F. *et al.*, Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: A novel approach to the treatment of psychosis, *Neuropharmacology*. **51**, 2006, s. 386-396.

Sun D., Courtney H. S., Beachey E. H., Berberine sulfate blocks adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells, fibronectin, and hexadecane, *Antimicrob Agents Ch.* **32**, 1988, s. 1370-1374.

Šifner F., Stručný přehled systému prvoků a bezobratlých živočichů, Praha: Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, 2004, 80 s.

Taylor S., Berridge V., Medicinal plants and malaria: an historical case study of research at the London School of Hygiene and Tropical Medicine in the twentieth century, *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **100**, 2006, s. 707-714.

Thulkar J., Agarwal N., Kriplani A., A comparative study of oral single dose of metronidazole, tinidazole, secnidazole and ornidazole in bacterial vaginosis, *Indian J Pharmacol.* **44**, 2012, s. 243-245.

Unterlinner B., Lenz R., Kutchan T. M., Molecular cloning and functional expression of codonine reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*, *Plant J.* **18**, 1999, s. 465-475.

Valentová K., Entnerová P., Urbaníková J. *et al.*, Chemie mužské sexuality, *Chem Listy* **98**, 2004, s. 1119-1129.

Vasilakopoulou A., Dimarongona K., Samakovli A. *et al.*, *Balantidium coli* Pneumonia in an Immunocompromised Patient, *Scand J Infect Dis.* **35**, 2003, s. 144-146.

Villegas L. R., Kottom T. J., Limper A. H., Chitinases in *Pneumocystis carinii* pneumonia, *Med Microbiol Immun.* **201**, 2012, s. 337-348.

Villinski J., Dumas E., Chai H. *et al.*, Antibacterial Activity and Alkaloid Content of *Berberis thunbergii*, *Berberis vulgaris* and *Hydrastis canadensis*, *Pharm Biol.* **41**, 2003, s. 551-557.

Wheatley D. N., Rasmussen L., Tiedtke A., 1994. *Tetrahymena*: a model for growth, cell cycle and nutritional studies, with biotechnological potential, *Bioessays.* **16**, 1994, s. 367-372.

Wright C. W., Marshall S. J., Russell P. F. *et al.*, In Vitro Antiplasmodial, Antiamoebic, and Cytotoxic Activities of Some Monomeric Isoquinoline Alkaloids. *J Nat Prod.* **63**, 2000, s. 1638-1640.

www.sciencephoto.com/media/365095/enlarge (staženo 10. 8. 2012)

www.sukl.cz

<http://www.health-pic.com/pathogenesis-of-entamoeba-histolytica/> (staženo 24. 8. 2012)

Yan D., Jin Ch., Xiao X. *et al.*, Antimicrobial properties of berberines alkaloids in *Coptis chinensis* Franch by microcalorimetry, *J Biochem Bioph Meth.* **70**, 2008, s. 845-849.

Ye M., Fu Sh., Pi R. *et al.*, Neuropharmacological and pharmacokinetic properties of berberine: a review of recent research, *J Pharm Pharmacol.* **61**, 2009, s. 831-837.

Zhu F., Qian C., Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimers disease, *BMC Neurosci.* **7**, 2006, s. 78-86.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Autor: Michaela Muchová

Školitel: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Název diplomové práce:

Antiprotozoální aktivita přírodních látek

Narůstající rezistence vůči běžně používaným lékům v terapii protozoálních infekcí podnítila výzkum nových léčiv. Potenciálním zdrojem těchto léčiv mohou být přírodní látky. V této práci byla testována antiprotozoální aktivita isochinolinových alkaloidů berberinu, palmatinu a papaverinu. Vliv jednotlivých testovaných látek byl pozorován na jednobuněčném modelovém organismu *Tetrahymena thermophila*. Pomocí 24hodinového vícegeneračního testu byla stanovena procentuální inhibice růstu a rozmnožování tohoto prvoka. Z naměřených hodnot byla vypočítána střední inhibiční koncentrace 24hIC₅₀. Z testovaných látek největší antiprotozoální aktivitu vykazoval papaverin, dále tato aktivita klesala v pořadí papaverin > palmatin > berberin. Všechny alkaloidy měly vyšší antiprotozoální aktivitu než ornidazol, který byl použit jako standardní antiprotozoální látka.

Klíčová slova: antiprotozoální aktivita, berberin, palmatin, papaverin, ornidazol, *Tetrahymena thermophila*

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Author: Michaela Muchová

Supervisor: RNDr. Jitka Vytlačilová, Ph.D.

Title of diploma thesis:

Antiprotozoal activity of natural compounds

Increasing resistance to commonly used drugs in the treatment of protozoal infections has stimulated research of new drugs. Potential source of these new drugs could be found in natural substances. This thesis deals with testing of antiprotozoal activity of isoquinoline alkaloids berberine, palmatine and papaverine. The effect of individual tested compounds was observed on unicellular model organism *Tetrahymena thermophila*. Percentage inhibition of growth and reproduction of this protozoan was determined using 24-hour multi-generational test. Median inhibitory concentration 24hIC₅₀ was calculated from the measured values. Papaverine showed the strongest antiprotozoal activity among testing compounds. Antiprotozoal activity decreased in the following order papaverine > palmatine > berberine. All alkaloids had stronger antiprotozoal activity than ornidazole, which was used as a standard antiprotozoal agent.

Key words: antiprotozoal activity, berberine, palmatine, papaverine, ornidazole, *Tetrahymena thermophila*